

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

**EFEITO DA VITAMINA E SOBRE MARCADORES PERIFÉRICOS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS EM
HEMODIÁLISE**

Tese de Doutorado

PATRÍCIA DALL'AGNOL BIANCHI

Porto Alegre, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia

**EFEITO DA VITAMINA E SOBRE MARCADORES PERIFÉRICOS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS EM
HEMODIÁLISE**

PATRÍCIA DALL'AGNOL BIANCHI

Orientadora: Dra. Maria Cláudia Irigoyen

**Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas -Fisiologia, do
Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.**

Porto Alegre, agosto de 2007.

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também o que mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que outros crêm em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Cláudia Irigoyen, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de realização deste curso e conseqüentemente, de um grande sonho.

À Professora Adriane Belló Klein, pela orientação constante e objetiva, pela franqueza e amizade.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Fernando Thomé e ao Dr. Paulo Moreira, médicos responsáveis pelas Unidades de Hemodiálise onde o estudo foi realizado, pela confiança e apoio.

À Jaqueline Barp, pela grande contribuição na realização do trabalho, pelo companheirismo, pelas discussões, pelos inúmeros dias de trabalho, pelo desprendimento e pela nossa amizade. Obrigada!

Às equipes de enfermagem das Unidades de Hemodiálise, pela atenção e auxílio nos trabalhos de coleta.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do HCPA (GPPG) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Laboratório: Tânia, Helena, Maristela, Alex, Roberta, Paulo, Mariane, Ana Raquel, Francisca, Rafaela, Vinícius e Dona Ritinha pela convivência e amizade.

Aos pacientes, pelo voto de confiança. Meu respeito e minhas considerações.

À minha família, Mário e João Pedro, meus pais, Rubens e Clarice, e aos meus irmãos Gabriel e Carla, pelo apoio incondicional, carinho, amizade e amor. Vocês dão sentido a tudo isso!

EFEITO DA VITAMINA E SOBRE MARCADORES PERIFÉRICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES RENAI CRÔNICOS EM HEMODIÁLISE¹

A doença renal crônica é acompanhada por um complexo de patologias que podem estar associadas à hiperprodução de radicais livres. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de ferro utilizado no tratamento da anemia renal sobre marcadores periféricos de estresse oxidativo de pacientes renais crônicos que realizam hemodiálise. Em adição, avaliar o efeito do uso da vitamina E, como antioxidante no estresse oxidativo desses pacientes. No plasma, avaliaram-se os níveis de carbonilas, nitritos e nitratos, e nos eritrócitos, lipoperoxidação por quimiluminescência (QL) e atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase(CAT) e glutathione peroxidase(GPx). Foram conduzidas avaliações em cinco sessões de hemodiálise (HD). Na primeira sessão, avaliaram-se os efeitos da HD, e o paciente não recebeu nenhum tipo de intervenção com ferro ou vitamina E. Na sessão subsequente, foram avaliados os efeitos do ferro, e os pacientes receberam uma dose de sacarato de hidróxido de ferro III (100mg). Nas demais avaliações, foram observados os efeitos da vitamina E (400mg e 800mg), associados aos do ferro. Os dados obtidos neste trabalho mostram que uma sessão de HD não modifica os níveis de dano oxidativo a lipídios (17144 ± 772 cps/mg Hb) e proteínas ($11,6 \pm 0,66$ nmol/mg prot). A atividade da CAT ($7,30 \pm 0,77$ Pmoles/mg prot) e a atividade da GPx ($4,8 \pm 0,42$) não apresentaram variação significativa por até 48h após sessão de HD. A SOD apresentou um aumento significativo imediatamente após HD (Pré HD $2,1 \pm 0,44$; Pós HD $4,4 \pm 0,46$ U/mg prot) ($p < 0,0001$) e estes valores retornavam aos observados antes da HD na avaliação realizada 48h após o procedimento ($2,9 \pm 0,26$ U/mg prot). Os níveis de nitratos não apresentaram variação significativa até 48h após HD ($1,39 \pm 0,26 \mu\text{M}$), já os níveis de nitritos apresentaram aumento significativo imediatamente após HD (pré HD $0,072 \pm 0,02$; Pós HD $0,172 \pm 0,04 \mu\text{M}$) ($p = 0,0033$), retornando aos valores iniciais na avaliação realizada 48h após HD ($0,059 \pm 0,008 \mu\text{M}$). A suplementação com 100 mg de hidróxido de ferro III não modificou os níveis de dano oxidativo a lipídios e proteínas observados nesses pacientes. A vitamina E, administrada por via oral, é uma opção eficaz na redução do estresse oxidativo dos pacientes em hemodiálise. Independente da dose utilizada, a vitamina E reduziu significativamente os níveis de oxidação de lipídios (Pré HD Controle 17144 ± 772 ; Pré HD VitE dose única 800mg 10997 ± 679 ; Pré HD VitE 400mg/dia 12936 ± 1008 ; Pré HD VitE 800mg/dia 8239 ± 275 cps/mg Hb) ($p < 0,0001$) e proteínas (Pré HD Controle $11,58 \pm 0,66$; Pré HD VitE dose única 800mg $10,33 \pm 0,68$; Pré HD VitE 400mg/dia $10,11 \pm 0,50$; Pré HD VitE 800mg/dia $5,74 \pm 0,41$ nmol/mg prot) ($p < 0,0001$), sendo o uso contínuo de 800 mg/dia, por trinta dias, mais efetivo. Portanto, a adição da vitamina E, devido a sua capacidade antioxidante, foi eficiente na redução do dano oxidativo nos doentes renais crônicos em fase final da doença.

¹ Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (162.p.) Agosto, 2007.

EFFECT OF VITAMIN E ON PERIPHERAL OXIDATIVE STRESS MARKERS IN CHRONIC RENAL FAILURE PATIENTS UNDER HEMODIALYSIS ¹

Chronic renal failure is accompanied by a complex of pathologies which may be associated to hyperproduction of free radicals. This study aimed to evaluate the effect of iron supplementation used to treat renal anemia on peripheral oxidative stress markers in chronic renal failure patients under hemodialysis. In addition, it also aimed to evaluate the effect of vitamin E as an antioxidant in the oxidative stress of these patients. In the plasma, the levels of carbonyls, nitrite and nitrate were evaluated, and in the erythrocytes, lipoperoxidation for chemiluminescence (QL) and antioxidant enzyme activities, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Evaluations were carried out on five hemodialysis sessions (HD). The first session evaluated the effects of HD and the patient did not receive any iron or vitamin E intervention. The subsequent session evaluated the effect of iron and the patients received an iron hydroxide saccharate III dosis (100mg). The effects of vitamin E (400mg and 800mg), associated with iron, were evaluated in the following sessions. Data obtained in this research work show that a single HD session does not modify the levels of oxidative damage to lipids (17144 ± 772 cps/mg Hb) and proteins (11.6 ± 0.66 nmol/mg prot). CAT activity (7.30 ± 0.77 Pmoles/mg prot) and GPx activity (4.8 ± 0.42) did not show any significant variation until 48h after the HD session. SOD showed a significant increase immediately after HD (Pre HD 2.1 ± 0.44 ; Pos HD 4.4 ± 0.46 U/mg prot) ($p < 0,0001$) and these values returned to those obtained before HD in the evaluation performed 48h after the procedure (2.9 ± 0.26 U/mg prot). Nitrate levels did not show any significant variation until 48h after HD ($1.39 \pm 0.26 \mu\text{M}$), but nitrite levels showed a significant increase immediately after HD (pre HD 0.072 ± 0.02 ; pos HD $0.172 \pm 0.04 \mu\text{M}$) ($p = 0,0033$), returning to initial values when evaluated 48h after HD ($0.059 \pm 0.008 \mu\text{M}$). Supplementation with 100mg iron hydroxide III did not modify the levels of oxidative damage to lipids and proteins in the patients. Vitamin E orally administered is an efficient option to reduce oxidative stress in patients under HD. Independently of the dosis used, vitamin E significantly reduced lipids oxidative levels (pre HD Control 17144 ± 772 ; Pre HD VitE single dosis 800mg 10997 ± 679 ; Pre HD VitE 400mg/day 12936 ± 1008 ; Pre HD VitE 800mg/day 8239 ± 275 cps/mg Hb) ($p < 0.0001$) and proteins (pre HD Control 11.58 ± 0.66 ; Pre HD VitE single dosis 800mg 10.33 ± 0.68 ; Pre HD VitE 400mg/day 10.11 ± 0.50 ; Pre HD VitE 800mg/day 5.74 ± 0.41 nmol/mg prot) ($p < 0.0001$), the use of 800mg/day continuously for a thirty-day period being more effective. Thus, the addition of vitamin E, due to its antioxidant capacity, was efficient to reduce oxidative stress in end-stage renal disease patients.

¹ Doctoral Thesis in Biological Sciences - Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (162p.) August, 2007.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Insuficiência Renal Crônica	1
1.2 Anemia na Insuficiência Renal Crônica	4
1.3 Espécies Ativas de Oxigênio, Espécies Ativas de Nitrogênio, Estresse Oxidativo e Estresse Nitrosativo	7
1.4 Antioxidantes	12
1.5 Estresse Oxidativo na Uremia	16
1.6 Suplementação de ferro: riscos e benefícios	21
1.7 Hipótese	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Indivíduos	31
3.2 Coleta Sangüínea	35
3.3 Avaliação do Estresse Oxidativo	36
3.3.1 Preparo do Sangue para Avaliação do Estresse Oxidativo	36
3.3.2 Dosagem de Hemoglobina	37
3.3.3 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH	37
3.3.4 Mensuração de Proteínas	38
3.3.5 Superóxido Dismutase	39
3.3.6 Catalase	40
3.3.7 Glutationa Peroxidase (GPx)	41
3.3.8 Oxidação de Proteínas – Método das carbonilas	42
3.4 Avaliação do Metabolismo do Óxido Nítrico	44
3.4.1 Determinação de Nitratos e Nitritos	44
3.5 Avaliação Complementar	45
3.6 Análise Estatística	45
4. RESULTADOS	47
4.1 Avaliação 1 - Sessão Controle	47
4.2 Avaliação 2 - Sessão Ferro	58
4.3 Avaliação Ferro	66
4.4 Vitamina E	79
5. DISCUSSÃO	87

6.	CONCLUSÕES	111
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
8.	ANEXOS	136
	ANEXO 1- Parecer da Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde – HCPA.....	137
	ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	138
9.	APÊNDICES.....	140
	APÊNDICE A – Artigo submetido ao periódico Nephron.....	141

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Níveis de ferritina, níveis de transferrina e, níveis de proteína reativa C, antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (Pós HD Ferro – 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa	58
TABELA 2 - Hematócrito e hemoglobina 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E, e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias)	67
TABELA 3- Níveis de colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL, 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E, e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias)	68
TABELA 4- Níveis de ferritina, níveis de transferrina e, níveis de proteína reativa C 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E, e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias)	70
TABELA 5- Concentração de uréia e ácido úrico 24 horas após após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E, e100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias)	71

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Fluxograma do Protocolo Experimental com as determinações previstas e janelas temporais em que foram realizadas as determinações	34
FIGURA 2 - Concentração de uréia (I) e de ácido úrico (II) em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise	49
FIGURA 3 - Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas medida por carbonilas (II) em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise	51
FIGURA 4 - Atividade das enzimas antioxidantes, Catalase-CAT (I) e Superóxido Dismutase-SOD (II), em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise	53
FIGURA 5 - Atividade da enzima antioxidante Glutaciona Peroxidase (GPx) em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise	55
FIGURA 6 - Níveis de nitritos (I) e de nitratos (II), em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise	57
FIGURA 7 - Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas medida em carbonilas (II), antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa	60
FIGURA 8 - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa	62
FIGURA 9 - Atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase (GPx) antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa	63
FIGURA 10 - Níveis de nitritos (I) e de nitratos (II) antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa	65
FIGURA 11 - Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas-Carbonilas (II), 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós	

- HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E, e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia) 73
- FIGURA 12 - Atividade das enzimas antioxidantes catalase-CAT (I) e superóxido dismutase-SOD (II), 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E, e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia) 75
- FIGURA 13 - Atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E, e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia) 76
- FIGURA 14 - Níveis de nitritos (I) e nitratos (II), 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E, e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e, 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia) 78
- FIGURA 15 - Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas medida em carbonilas (II), antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e, antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia) 81
- FIGURA 16 - Atividade das enzimas antioxidantes catalase-CAT (I) e superóxido dismutase-SOD (II), antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e, antes de uma HD com

administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia)	83
FIGURA 17 - Atividade da enzima antioxidante glutationa peroxidase (GPx) antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e, antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia)	84
FIGURA 18 - Níveis de nitritos (I) e nitratos (II), antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e, antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia)	86

RELAÇÃO DE REAÇÕES

	Página
REAÇÃO 1 - Formação das EAO a partir da redução do O ₂	8
REAÇÃO 2 - Reação de Fenton	9
REAÇÃO 3 - Reação de Haber-Weiss	9
REAÇÃO 4 - Reação do óxido nítrico (NO) com o radical superóxido (O ^{•-}) formando o ânion peroxinitrito (ONOO ⁻)	11
REAÇÃO 5 - Dismutação do radical superóxido pela SOD	14
REAÇÃO 6 - Decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase	14
REAÇÃO 7 - Redução de hidroperóxidos (ROOH) pela glutathiona peroxidase (GPx) e regeneração da glutathiona (GSH) pela glutathiona redutase (GR)	15
REAÇÃO 8 - Reação de redução do oxigênio à radical superóxido, por ação do íon ferroso	23
REAÇÃO 9 - Restauração do íon férrico. Dismutação de duas moléculas de ânion superóxido, formando oxigênio e peróxido de hidrogênio.(A _{red} – antioxidante reduzido; A _{ox} – antioxidante oxidado)	23
REAÇÃO 10 - Reação onde íon ferroso catalisa a decomposição de peróxidos resultando em radical hidroxil (OH [•]) ou alcóxil (LO [•])	23

RELAÇÃO DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1 - Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão Científica e pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre	137
ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	138

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE A - Artigo submetido ao periódico Nephron.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADMA – Dimetilarginina assimétrico
- CAPD – Diálise peritoneal ambulatorial contínua
- CAT – Catalase
- DNA – Ácido desoxi-ribonucléico
- EAO – Espécies ativas de oxigênio
- EAN – Espécies ativas de nitrogênio
- EDRF – Fator de relaxamento derivado do endotélio
- ERH – Eritropoetina recombinante humana
- Fe²⁺ - Íon ferroso
- Fe³⁺ - Íon férrico
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona reduzida
- GSSG – Glutaciona oxidada
- HD – Hemodiálise
- HDL - Lipoproteínas de alta densidade
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HPLC – Cromatografia líquida de alta performance
- OH· - Radical hidroxil
- IRC – Insuficiência renal crônica
- LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
- LPO – Lipoperoxidação

MDA – Malondialdeído

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

$O_2^{\cdot-}$ - Ânion radical superóxido

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

PCOOH – Hidroperóxido de fosfatidilcolina

PRC – Proteína Reativa C

QL – Quimiluminescência

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP – Capacidade antioxidante total

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência Renal Crônica

Insuficiência renal crônica (IRC) é uma síndrome em que ocorre perda progressiva e irreversível da função renal. Com ela, os néfrons remanescentes, saudáveis ou menos lesados tendem a compensar a falta de massa renal destruída, hipertrofiando e aumentando sua função. Essa adaptação mantém o equilíbrio eletrolítico e ácido-básico, com manifestações clínicas e laboratoriais mínimas. Quando ocorre perda de uma grande quantidade de néfrons, mesmo que a causa inicial do dano tenha sido eliminada, há progressão da doença com aumento do declínio da função renal. Proteinúria e glomeruloesclerose focal desenvolvem-se nos néfrons remanescentes. A progressão da perda da função renal leva à insuficiência renal terminal, com conseqüências metabólicas, apresentando sinais e sintomas variáveis e progressivamente intensos. Os termos síndrome urêmica ou uremia referem-se ao conjunto de sinais e sintomas apresentados pelos pacientes renais crônicos, que são conseqüência ou estão associados às doenças que evoluem para a redução progressiva da massa renal (THOMÉ et al., 1999).

Os fatores etiológicos da IRC envolvem doenças primárias do rim, doenças sistêmicas e doenças hereditárias. As suas causas mais comuns são: diabetes melito, glomerulonefrites, nefrosclerose hipertensiva, doença renovascular, rins policísticos, uropatias obstrutivas e malformações congênitas (NISSENSON, 2002). Porém, duas situações são etiopatogenicamente mais importantes: o diabetes melito e a hipertensão arterial sistêmica, ambas condições bastante prevalentes na população em geral.

Entretanto, do ponto de vista de saúde pública, a IRC não costuma ser lembrada como problema freqüente ou causador de alta mortalidade, mas sim pelo seu alto custo social, que é desproporcional à sua incidência.

O tratamento da IRC terminal envolve alguma forma de diálise ou transplante renal, este disponível apenas a uma minoria dos pacientes afetados. O crescimento no número de pacientes em diálise, a possibilidade de tratamento para pacientes mais graves que no passado e a maior disponibilidade para transplante renal ocasionaram um aumento no número de pacientes em tratamento dialítico crônico em todo o mundo nos últimos anos.

Os avanços nas áreas de engenharia, farmacologia e biotecnologia associados a maior compreensão da fisiopatologia das doenças renais contribuíram para melhorar o manejo de pacientes portadores de insuficiência renal crônica, especialmente daqueles que necessitam de algum tipo de tratamento dialítico para sobreviver, repercutindo em melhora da qualidade de vida desses indivíduos (ABENSUR, 1995).

A doença renal crônica é considerada atualmente problema de saúde pública mundial. O aumento da incidência desta vem sendo observado e ocorre principalmente em virtude da maior expectativa de vida e do aumento da prevalência do diabete melito e hipertensão arterial na população em geral. As estimativas para 2010 nos EUA alcançam números da ordem de 520.000 pacientes em diálise e 178.000 pacientes transplantados, com um aumento na população de pacientes renais crônicos projetados em 4,1% ao ano (XUE et al., 2005).

Segundo o Censo Nefrológico, divulgado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, no ano de 2001, existiam no Brasil 518 centros de tratamento de doenças renais com um total de 48.806 pacientes atendidos. Destes, 89,53% realizavam hemodiálise (HD). Nesse período, o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou R\$ 727,7

milhões para pagamento de terapia renal substitutiva, o que corresponde a 14,6% do total de gastos ambulatoriais. Esses números tornaram-se maiores e, no censo de 2002, já existiam no Brasil cerca de 560 centros de tratamento, com 54.523 pacientes, estando 89,63% em HD. Os números continuam aumentando; o Censo Nefrológico, de janeiro de 2006, mostrou que nesse ano, nos 619 centros de tratamento de doenças renais no Brasil, havia 70.872 pacientes em tratamento. Destes, 91% em tratamento hemodialítico e 9% em diálise peritoneal. O SUS é o responsável pelo tratamento de 89% de todos os pacientes em tratamento renal no Brasil, e os outros 11% são financiados por outros convênios. Existia, na época da divulgação dos dados, uma fila de espera para transplante renal de 33.247 pacientes, sendo destes 3.872 da região sul do Brasil.

A taxa de incidência da insuficiência renal crônica no Brasil é de 175 pacientes por milhão da população. O aumento anual 2005-2006 foi de 8,8%, e a taxa de mortalidade de 13%, sendo o número de óbitos, durante o ano de 2005, 12.528 pacientes. O Censo Nefrológico apresentou também dados referentes à condição física desses pacientes; foi detectado que, na região sul do Brasil, 43% dos doentes renais apresentaram percentagem de hemoglobina inferior a 11g%.

HD é definido como um processo de transferência de massa baseado na difusão entre sangue e líquido de diálise, modulado por uma membrana semipermeável (THOMÉ et al., 1999).

Através de acessos vasculares, é obtido o sangue para HD, sendo impulsionado para um sistema de circulação sanguínea extracorpórea, passando por um sistema formado pelo fornecimento de líquido de diálise e um filtro, com uma membrana semipermeável, no qual sangue e líquido de diálise se encontram, permitindo trocas de água e soluto por difusão. O líquido de diálise é composto por uma solução concentrada de eletrólitos e uma quantidade de água purificada que a dilui. Essa solução é então aquecida e deaerada, para

que possa então entrar em contato com o sangue. O filtro dialisador compreende dois compartimentos: um por onde circula o sangue e outro, a solução de diálise. A comunicação ocorre por uma membrana semipermeável disposta de modo a ampliar ao máximo a área de contato entre os dois líquidos. Cada compartimento tem um ponto de entrada e outro de saída e a circulação ocorre num sentido de contracorrente. A membrana dialisadora pode estar disposta em paralelo formando placas ou constituindo finos tubos capilares dispostos em feixe. O sangue entra por uma ponta, distribuindo-se por dentro desses inúmeros capilares, até sair na outra extremidade. Externamente a essas fibras, circula a solução de diálise (THOMÉ et al., 1999).

O material que compõe a membrana de diálise pode ser de três tipos distintos: celulose e análogos (cuprofane); celulose substituída (acetato de celulose); e membranas sintéticas (poliacrilonitrila, polissulfona). A biocompatibilidade das membranas sintéticas é maior que a das outras, enquanto as de celulose modificada são mais biocompatíveis do que a das membranas de celulose (THOMÉ et al., 1999).

A HD intermitente é uma modalidade de HD em que os fluxos de sangue e de líquido de diálise são relativamente altos, 300ml/min e 500ml/min, propiciando depurações elevadas. Realizam-se, em média, sessões de quatro horas de tratamento, duas a três vezes por semana, conforme as necessidades do paciente (THOMÉ et al., 1999).

1.2 Anemia na Insuficiência Renal Crônica

A anemia normocítica e normocrômica está presente na maior parte dos pacientes com insuficiência renal crônica. É uma das complicações de maior impacto na qualidade de vida dos pacientes urêmicos, repercutindo em piora da qualidade de vida e maior morbidade e mortalidade nessa população. A anemia também parece ser um fator

responsável pelo agravamento da doença renal (BEUSTERIEN et al., 1996; GOUVA et al., 2004).

A anemia é determinada por diferentes fatores: a deficiência relativa de eritropoetina, carência de ferro, inflamação, perdas sangüíneas, diminuição do tempo de vida das hemácias e carência de ácido fólico e vitamina B12 (ECKARDT, 2000). Ela se desenvolve quando a filtração glomerular cai a menos de 30% do normal e está presente em 90% dos pacientes que se encontram em diálise crônica. Usualmente é grave, com hematócrito menor que 25%, obrigando a transfusões sangüíneas, o que é caro; ocorre também o risco de transmissão de doenças infecciosas. A anemia dos doentes renais é bastante importante nos pacientes em diálise, podendo a redução nos eritrócitos chegar até 50%.

A perda de sangue, a destruição aumentada das hemácias, e a redução da eritropoiese são determinantes na instalação da anemia nos doentes renais crônicos. Estima-se que cada mL de sangue contém cerca de 0,5 mg de ferro, de forma que a perda de sangue e a deficiência de ferro estão intimamente relacionadas. A perda de sangue nos pacientes que realizam hemodiálise ocorre principalmente por problemas gastrintestinais e ginecológicos ou em virtude do procedimento hemodialítico e da coleta de amostras para exames complementares. Segundo Akmal et al. (1994) pacientes em hemodiálise perdem, durante um ano, em torno de 1 a 4 litros de sangue, o que equivale a aproximadamente 0,5 a 2,0 g de ferro. Por semana, esses valores correspondem a cerca de 50 a 200 mg de ferro.

As hemácias também apresentam um tempo médio de vida reduzido de um valor normal em torno de 120 dias para cerca de 60 dias, porém o principal fator envolvido na anemia da IRC é a deficiência absoluta ou relativa de eritropoetina, que é uma glicoproteína produzida principalmente no rim, com peso molecular de 18.400 dáltons e

composta por 197 aminoácidos. Esse hormônio interage com receptores de alta e baixa afinidade presentes nas células responsivas, que são os precursores eritróides.

Quando não tratada, a anemia induz adaptações no sistema cardiovascular com o objetivo de aumentar a oferta de oxigênio para os tecidos. Foi comprovada a associação entre anemia e presença de hipertrofia ventricular esquerda e dilatação do ventrículo esquerdo em pacientes renais crônicos. Além disso, está associada à angina, insuficiência cardíaca congestiva e diminuição da acuidade mental e cognitiva. Em crianças, ela está associada a retardo do crescimento e, em adultos, à diminuição na sobrevida, qualidade de vida, reabilitação social e profissional (THOMÉ et al., 1999).

A redução da qualidade de vida é determinada por vários fatores que vão desde sintomas somáticos até restrições impostas pelo próprio tratamento. A anemia aumenta a fadiga, diminui a capacidade de trabalho, a tolerância ao exercício, o apetite, a libido e altera o sono (KOKOT et al., 1998; CANZIANI, 2000).

Estudos mais recentes têm demonstrado que a anemia é uma complicação freqüente da doença renal crônica, mesmo nos seus estágios iniciais. A anemia nestes pacientes se deve principalmente à redução na produção de eritropoetina pela massa diminuída de fibroblastos peritubulares do córtex renal funcionantes (CANZIANI et al., 2006). A prevalência da anemia aumenta à medida que a fração de filtração diminui, sendo essa associação precoce (ABENSUR et al., 2004).

A disponibilidade de eritropoetina recombinante humana (ERH) possibilitou um importante avanço no tratamento da anemia na IRC. Melhora na qualidade de vida, aumento da capacidade física, diminuição da insônia, melhora na função sexual, melhora do apetite, melhora das funções cognitivas e cardiorrespiratórias têm sido repetidamente demonstradas (BARROS et al., 1999; MORENO et al., 1996).

O tratamento com eritropoetina eleva os níveis de hemoglobina e hematócrito na presença de estoques adequados de ferro. A correção da anemia resulta em melhora do estado geral, com queda do débito cardíaco, aumento da resistência periférica, diminuição do tempo de sangramento e, principalmente, redução da necessidade de transfusões sanguíneas, pois essas podem veicular doenças infecciosas (BEUSTERIEN et al., 1996).

1.3 Espécies Ativas de Oxigênio, Espécies Ativas de Nitrogênio, Estresse Oxidativo e Estresse Nitrosativo

A doença renal crônica é acompanhada por um complexo de patologias. Algumas manifestações, como envelhecimento acelerado, catarata, aterosclerose, diminuição das células vermelhas do sangue, aumento da hemólise e disfunção plaquetária, estão presentes nos indivíduos, e essas patologias podem estar associadas à hiperprodução de radicais livres (PAUL et al., 1993; KAW & MALHOTRA, 2006).

Radical livre é qualquer molécula capaz de existência independente que possua um ou mais elétrons desemparelhados, geralmente no seu orbital mais externo. Os radicais livres são altamente reativos e capazes de agredir qualquer biomolécula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

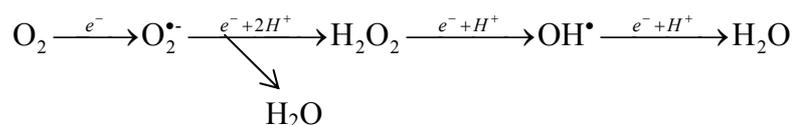
Espécies ativas de oxigênio (EAO), e as espécies ativas de nitrogênio (EAN) são produtos do metabolismo celular normal. EAO e EAN são conhecidas por terem um papel duplo, com efeitos deletérios, mas também com efeitos benéficos sobre os sistemas biológicos (VALKO et al., 2006).

A geração das espécies ativas de oxigênio (EAO) ocorre durante os processos de oxidação biológica, dentre os quais pode-se citar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa para formação de ATP na mitocôndria. As principais EAO são: ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH)

Ainda deve-se relatar o estado “singlet”, que também pode causar danos à célula (DRÖGE, 2002).

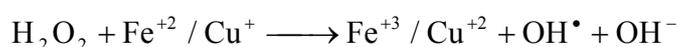
Cada EAO possui características e tempo de meia-vida próprias, apresentando diferentes reatividades . As formas de O₂ mais reativas são os oxigênios “singlets”, que não possuem restrição de spin, e por isso, são muito mais reativas que o O₂ molecular em seu estado fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O O₂ singlet (O₂) é uma forma reativa do oxigênio, na qual um dos elétrons desemparelhados foi movido do seu estado fundamental e pode ser gerado pelo fornecimento de energia (VOEGELL et al., 1992).

O ânion radical superóxido (O₂^{•-}) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água. É o principal produto das EAO, a partir do qual serão formadas as demais EAO. Sua dismutação é catalizada pela enzima superóxido dismutase, que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação em 10⁴ vezes a frequência da dismutação espontânea do superóxido num pH fisiológico (YU, 1994). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é o segundo intermediário do processo oxidativo, pode ser produzido indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do radical superóxido, ou pela redução bivalente do oxigênio molecular. É a forma menos reativa das EAO, porém pode originar o radical hidroxil (OH[•]), que é altamente reativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



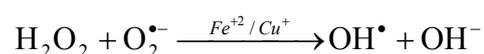
REAÇÃO 1 - Formação das EAO a partir da redução do O₂.

O radical hidroxil é um dos mais potentes oxidantes. Ele é formado através de reações que necessitam da presença de íons metais de transição como ferro e o cobre. A reação do peróxido de hidrogênio com íons ferroso ou cúprico é chamada de reação de Fenton e leva à produção do radical hidroxil, altamente reativo. Essa reação é apresentada abaixo (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994; LIOCHEV & FRIDOVICH, 2002; VALKO et al., 2005; LEONARD et al., 2004).



REAÇÃO 2 - Reação de Fenton.

Esse radical pode também ser formado a partir da reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio em presença de íons divalentes de metais de transição. Essa reação foi descrita por Haber-Weiss em 1934, e é representada abaixo (LIOCHEV & FRIDOVICH, 2002).



REAÇÃO 3 - Reação de Haber-Weiss.

A vida em aerobiose é caracterizada pela produção contínua de EAO, que é contrabalançada pelo sistema de defesa antioxidante. Em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando ocorre aumento na produção de EAO, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é rompido em favor dos agentes

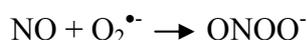
pró-oxidantes. Nessa situação, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob estresse oxidativo com potenciais danos (BELLÓ-KLEIN, 2002; LLESUY, 2002).

Os radicais livres se formam em sistemas biológicos e são reativos pela sua natureza radicalar. A toxicidade do estresse oxidativo sobre as células pode se dar de diferentes maneiras: através da lipoperoxidação das membranas celulares ou intracelulares, degradação de proteínas, dano ao ácido desoxirribonucléico nuclear (DNA) e inativação enzimática. O mecanismo exato pelo qual as células são injuriadas não é bem claro. O estresse oxidativo tem sido implicado num grande número de doenças humanas como também no processo de envelhecimento (DRÖGE, 2002; VALKO, et al., 2007).

O processo pelo qual as EAO atacam as membranas biológicas é chamado de lipoperoxidação (LPO). A LPO é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Porém, como as membranas celulares são formadas na maior parte por lipídios insaturados e proteínas, essas membranas ficam muito vulneráveis ao ataque oxidativo. Esse processo pode alterar propriedades da membrana, principalmente a permeabilidade e a capacidade de transporte, podendo, assim, levar à liberação de enzimas que degradam os lisossomas destruindo as células e levando à morte celular. A LPO é um processo de reação em cadeia que pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (LLESUY, 2002). O radical hidroxil é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora mais importante da LPO (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

As proteínas sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EAO que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Também pode haver ataque ao DNA, pelo radical hidroxil, identificado pela presença de bases oxidadas de DNA como a 8-hidroxideoxiguanosina, assim como o DNA mitocondrial, já que a mitocôndria é grande fonte de EAO (YU, 1994).

Além das EAO, existem os radicais livres derivados do nitrogênio. O óxido nítrico (NO) é uma espécie ativa do nitrogênio (EAN); é um radical livre devido ao elétron não pareado, reage facilmente com o radical superóxido, não apenas reduzindo sua meia vida, como também produzindo o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), que é altamente reativo (Reação 4) (MAXWELL, 2002). Portanto, disfunção na via do NO pode ocorrer por aumento do estresse oxidativo, levando a alterações na função endotelial dos indivíduos.



REAÇÃO 4 - Reação do óxido nítrico (NO) com o radical superóxido (O^{•-}) formando o ânion peroxinitrito (ONOO⁻).

O NO é sintetizado por um grupo de enzimas, as enzimas óxido nítrico sintases (NOS), convertem o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO (GHAFOURIFAR & CADENAS, 2005). O NO é um gás hidrofóbico capaz de difundir-se através da membrana plasmática das células endoteliais. É responsável por controlar o tônus vascular e conhecido como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF); além de realizar vasodilatação, o NO é responsável por inibir a agregação plaquetária, a adesão de leucócitos ao endotélio, produção de endotelinas (atividade vasoconstritora) e, ainda, neurotransmissão, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso e regulação da pressão arterial.(LOWE, 2000; NOHL, 1993).

O NO tem uma meia vida de somente poucos segundos em meio aquoso. O NO tem grande estabilidade em um meio com baixa concentração de oxigênio contudo, é solúvel tanto no meio aquoso quanto no meio lipídico, e se disponível, difunde através do citoplasma e membranas plasmáticas. Tem efeitos na transmissão neuronal como também na plasticidade sináptica do sistema nervoso central. No meio extracelular o NO reage com oxigênio e água para formar nitratos (NO₃⁻) e nitritos (NO₂⁻). O nitrato e o nitrito são os

principais metabólitos fisiológicos produtos da oxidação do NO em meio aquoso e podem ser mensurados como índices da produção do NO em um determinado sistema biológico (VALKO et al., 2007).

A produção exacerbada de espécies ativas de nitrogênio levam ao estresse nitrosativo, isso pode ocorrer quando a geração de espécies ativas de nitrogênio nos sistemas excede a sua capacidade de neutralizá-las ou eliminá-las. O estresse nitrosativo pode levar a reações de nitrosilação que podem alterar a estrutura ou inibir a função normal de proteínas (VALKO et al., 2007).

Células do sistema imune produzem NO e ânion superóxido durante o *burst* oxidativo que ocorre durante processos inflamatórios. Nesta condição o NO e o ânion radical superóxido podem reagir entre si produzindo uma molécula com maior capacidade oxidativa, o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), esta molécula é capaz de gerar fragmentação do DNA e lipoperoxidação (CARR et al., 2000; VALKO et al., 2007).

1.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são encarregados de manter baixas as concentrações de EAO. Atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (LLESUY, 2002). Essas substâncias minimizam os distúrbios no meio interno e preservam a ótima atividade celular, além de estarem estrategicamente situadas nas organelas celulares para que assim possam proteger a célula (YU, 1994).

As defesas antioxidantes compreendem: agentes que cataliticamente removem radicais livres e outras espécies reativas, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidases; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como íons ferro e cobre ou como as transferrinas e hepatoglobinas; proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, como as proteínas de choque térmico; e substâncias de

baixo peso molecular que combatem EAO e EAN, glutatona, α tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros. Alguns antioxidantes de baixo peso molecular provêm da dieta, especialmente o ácido ascórbico e o α tocoferol. Existe aí uma relação íntima entre nutrição e defesa antioxidante. A importância da atividade antioxidante contra o estresse oxidativo depende de qual espécie ativa foi gerada, como é gerada, onde é gerada e qual é o alvo de dano (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A atividade das defesas antioxidantes varia com o tipo celular e, possivelmente, em diferentes células do mesmo tecido. Fluidos extracelulares têm diferentes mecanismos protetores comparados aos intracelulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

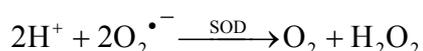
Uma substância antioxidante que, na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação, age formando um composto menos reativo chamado “scavenger”. Se a substância antioxidante absorver energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é chamada de “quencher” (SIES, 1999; HALLIWELL, 1997).

Habitualmente, o sistema antioxidante é dividido em sistema enzimático e não enzimático.

Entre as defesas enzimáticas, encontra-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx) (LLESUY, 2002; YU, 1994; SIES, 1999; VALKO et al., 2007). Essas enzimas evitam o acúmulo de radical superóxido e peróxido de hidrogênio para que não haja produção do radical hidroxil, que é altamente reativo e para o qual não existe um sistema enzimático de defesa (YU, 1994).

Nos mamíferos, já estão descritas três isoformas de SOD: a citosólica, que contém em sua estrutura cobre (Cu) e zinco (Zn); a mitocondrial, que contém manganês (Mn) e, por último, uma forma extracelular que também contém Cu-Zn em sua estrutura (LLESUY, 2002).

A superóxido dismutase, nas suas diferentes isoformas, dismuta eficazmente dois íons superóxido formando peróxido de hidrogênio e oxigênio, reação 5. Esta reação é extremamente vantajosa para o organismo uma vez que o peróxido de hidrogênio é menos reativo e possui um sistema antioxidante eficaz contra ele (YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

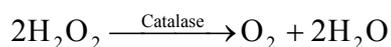


REAÇÃO 5 - Dismutação do radical superóxido pela SOD.

A SOD extracelular é uma glicoproteína com estrutura tetramérica. Essa isoforma é a responsável pela maior parte da atividade da SOD no plasma (LLESUY, 2002).

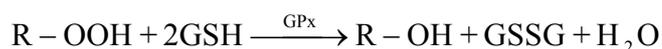
A produção do peróxido de hidrogênio é um evento fisiológico diretamente relacionado ao consumo de O_2 . Nos mamíferos, o H_2O_2 não só é detoxificado pela catalase, reação 6, como também por outras peroxidases, formando água e oxigênio (LLESUY, 2002). A ação destas enzimas impede a formação do radical hidroxil e conseqüente dano celular.

A catalase é uma enzima presente em todos os tipos de células de mamíferos e altamente específica, pois possui atividade apenas contra peróxidos de hidrogênio de etila e metila (CHANCE et al., 1979).



REAÇÃO 6 - Decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase.

A terceira enzima desse sistema de defesa é a glutathione peroxidase (GPx), a mais importante das peroxidases. Essa enzima reage com uma grande variedade de peróxidos, principalmente peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (YU, 1994). Para redução dos peróxidos, utiliza o grupamento sulfidril da glutathione reduzida (GSH), que pode ser regenerada pela interação da forma oxidada com NADPH através da glutathione reductase (GR). Os grupamentos sulfidril doam hidrogênios formando uma ligação dissulfeto que pode transformar a molécula do peróxido em álcool ou, no caso do peróxido de hidrogênio, em água, como na reação 7 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



REAÇÃO 7- Redução de hidroperóxidos (ROOH) pela glutathione peroxidase (GPx) e regeneração da glutathione (GSH) pela glutathione reductase (GR).

Existem tipos diferentes de glutathione peroxidase: as que utilizam selênio como cofator e a selênio independente. As isoformas dependentes de selênio encontram-se solúveis no meio intracelular (citoplasmática), solúveis no plasma e presentes em membranas celulares. Essas enzimas metabolizam preferencialmente peróxido de hidrogênio. A glutathione selênio independente encontrada apenas no citosol celular, metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgânicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Dentro do sistema não enzimático de defesa, estão os antioxidantes lipofílicos, como os tocoferóis, carotenóides, bioflavonóides e os antioxidantes hidrofílicos, como a vitamina A, o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutathione e outros.

A vitamina E, α tocoferol, é o principal antioxidante lipossolúvel responsável pela proteção dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares contra o ataque

das EAO. Por ser lipossolúvel, a vitamina E aloja-se nas membranas celulares e nas lipoproteínas de baixa densidade. A perda de um elétron pela vitamina E transforma-a em radical livre – tocoferil, que reage com a vitamina C (ascorbato), regenerando-se a tocoferol. Por ser hidrossolúvel, o ascorbato transformado em ascorbil pela reação com o tocoferil pode ser facilmente eliminado pelo organismo ou pode também ser regenerado a ascorbato, utilizando GSH e NADPH. Por esse feito cooperativo com a vitamina E, protegendo as membranas celulares da toxicidade do oxigênio, aconselha-se que as duas vitaminas sejam ingeridas conjuntamente.

A glutathiona, além de ser um importante antioxidante não enzimático, participa de reações de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a glutathiona transferase. Sua ação antioxidante se deve à presença de um grupamento sulfidril, que atua como doador de elétrons (YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.5 Estresse Oxidativo na Uremia

As doenças ateroscleróticas cardiovasculares são preconizadas como a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes urêmicos. O desenvolvimento de aterosclerose acelerada envolve múltiplos fatores de risco. Alguns são similares aos relatados para a população em geral, como idade, tabagismo, diabete, hipertensão e dislipidemia. Outros, mais específicos, estão associados com as conseqüências da perda de néfrons e levam a distúrbios metabólicos, como hiperfibrinogenia, hiperhomocisteinemia e estresse oxidativo (NGUYEN-KHOA et al., 2001).

A fisiopatologia de eventos cardiovasculares na uremia é multifatorial, mas a aterosclerose acelerada parece ter papel central na disfunção cardiovascular e é biologicamente plausível que o estresse oxidativo contribua para a alta prevalência dessas doenças. Por isso, o envolvimento do estresse oxidativo tem sido usado para formulação de

hipóteses que visam explicar a alta incidência das doenças cardiovasculares em doentes renais crônicos (CLERMONT et al., 2000; LOUGHREY et al., 1994).

Alguns autores sugerem que a uremia é um estado pró-oxidante, com aumento nos níveis de lipoperoxidação e diminuição da atividade antioxidante (PAUL et al., 1993; SCHETTLER et al., 1994; BOAZ et al., 1999; HIRAYAMA et al., 2000). Não está clara, no entanto, a natureza desse estresse oxidativo e sua provável exacerbação pela diálise (HIRAYAMA et al., 2000; SCHETTLER et al., 1994).

Numerosos estudos têm identificado na doença renal crônica, em especial em pacientes que fazem hemodiálise, aumento na produção de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio. A ativação de macrófagos pode produzir espécies ativas de oxigênio em tese: pelo acúmulo de toxinas urêmicas; bio-incompatibilidade das membranas de diálise, influxo de endotoxinas da solução de diálise; e, desordens metabólicas como diabete e dislipidemia (KELLY et al., 2005).

A lipoperoxidação (LPO) tem sido associada com a patogênese de doenças comumente encontradas em indivíduos que realizam hemodiálise. Níveis plasmáticos aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador da peroxidação lipídica, têm sido relatados nos doentes renais crônicos que realizam tratamento dialítico (PAUL et al., 1993; SCHETTLER et al., 1994; CRISTOL et al., 1997; HIRAYAMA et al., 2000).

A LPO também foi avaliada através do TBARS no tecido adiposo subcutâneo de doentes renais crônicos. Os autores observaram que os níveis de TBARS eram maiores no tecido adiposo subcutâneo, se comparado com os níveis observados no plasma e eritrócitos desses pacientes. Observaram também que os níveis LPO em doentes renais crônicos, independentemente do nível da doença, eram significativamente mais elevados do que os níveis encontrados em indivíduos controle (GOTOH et al., 1997).

Os dados relacionados à atividade das enzimas antioxidantes são controversos. Enquanto autores, como Durak et al. (1994) e Paul et al. (1993) mostram e tentam explicar a redução na atividade das enzimas, outros, como Asoyama et al. (1990) não observaram alteração na atividade das enzimas antioxidantes em crianças urêmicas em hemodiálise ou diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD).

Em um estudo em que se avaliou a atividade da SOD nos eritrócitos de pacientes em HD recebendo terapia intravenosa de ferro, os pacientes foram divididos em grupos de acordo com seus níveis séricos de ferritina (<300; 301 a 600; >601 µg/L respectivamente). Os valores da atividade da SOD nos pacientes eram similares aos encontrados nos controles em todos os grupos estudados. Após infusão intravenosa de ferro, ocorreu uma diminuição significativa na atividade da SOD. Nesse estudo, observou-se também que a atividade de GPx no plasma e nos eritrócitos dos grupos com maior nível de ferritina eram mais altos que os encontrados nos controles. Não houve variação na atividade da GPx após infusão intravenosa de ferro (LIM et al., 1999). Um estudo utilizando diferentes tipos de membranas de diálise, uma delas modificada contendo vitamina E, com infusão ou não de vitamina C, durante uma única sessão de hemodiálise, observou que os níveis de SOD e GPx que eram mais baixos que os controles, não foram modificados pelo tratamento (EISELT et al., 2001).

Durak et al. (1994) observaram uma redução na atividade da catalase nos eritrócitos de doentes renais. A catalase estava reduzida em todos os grupos de pacientes desde aqueles em tratamento conservador com ou sem uso de drogas, como nos pacientes em tratamento dialítico, CAPD ou HD.

Os antioxidantes não enzimáticos nos pacientes em hemodiálise parecem estar, na maioria das vezes, mais baixos que os encontrados em pessoas saudáveis (WEINSTEIN et al., 2000). Clermont et al. (2000) e Eiselt et al. (2001) observaram uma depleção

acentuada de antioxidantes após sessão de HD. A depleção da capacidade antioxidante total que avalia principalmente antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis é atribuída, em grande parte, à eliminação do ácido úrico pela diálise, perda de antioxidantes causada pela remoção durante HD, devido ao baixo peso molecular dessas substâncias e, também, pela perda causada no combate à produção de radicais livres (WRATTEN et al., 2000).

Para tentar impedir o aumento do estresse oxidativo nesses pacientes, diversos estudos utilizando terapia com antioxidantes têm sido publicados. Cristol et al. (1997) observaram que os valores de malondialdeído (MDA), um marcador de lipoperoxidação, nos doentes renais em hemodiálise foram superiores aos encontrados nos controles, e que este aumento era independente da administração de eritropoetina. Após administração de suplementação oral de vitamina E (500 mg/dia), ocorria uma redução progressiva nas concentrações de MDA e um aumento nas concentrações de vitamina E nos eritrócitos.

Eiselt et al. (2001) estudaram o efeito de um tipo de membrana de hemodiálise modificada contendo vitamina E, associada ou não com infusão intradialítica de vitamina C. Em todos os grupos, o nível de TBARS era superior ao encontrado nos controles. Apenas no grupo que não utilizou a membrana modificada nem infusão de vitamina C é que houve um aumento nos níveis de TBARS no plasma, sugerindo um aumento na LPO.

Outras complicações, como hemorragia e hipotensão durante o curso da doença e tratamento hemodialítico, estão possivelmente associadas, em especial, à espécies derivadas do óxido nítrico. O óxido nítrico pode também ter efeitos deletérios devido a sua interação com o radical superóxido, formando o radical peroxinitrito, altamente reativo.

A característica de um estado de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes na uremia é potencializada após o início da HD. O olhar clínico para as terapias com antioxidantes aumenta, pois o organismo dispõe de substâncias que regulam a dinâmica do processo e o nível dessas pode ser aumentado através de suplementação e também através

de mudanças de hábitos dietéticos. A vitamina E, particularmente na forma de α -tocoferol, tem sido proposta para a prevenção ou tratamento de numerosas condições de doença, em alguns casos, com base em sua atividade antioxidante e, em outros, em sua característica anti-inflamatória. Assim, tem ocorrido crescente interesse nos possíveis benefícios da vitamina E nas doenças renais, pois apresentam níveis consideráveis de estresse oxidativo (THABET & CHAN, 2006).

A vitamina E possui em sua molécula um grupo hidroxila, do qual o átomo de hidrogênio é facilmente removido. Isso fornece o elétron necessário para preencher o orbital externo de qualquer radical próximo. A molécula de vitamina E fica, portanto, com um elétron desemparelhado preso ao anel por ressonância. O radical tocoferil formado pode reagir com outros antioxidantes, como a vitamina C, sendo regenerada ao seu estado original (YU, 1994). A vitamina E preserva a integridade das membranas biológicas, estabiliza sua permeabilidade e fluidez e previne a apoptose induzida por estresse oxidativo. Propicia a redução da adesão de monócitos no endotélio e a redução na concentração de superóxido. Ela inibe, também, a quimiotaxia dos neutrófilos e a agregação plaquetária (THABET & CHAN, 2006).

A vitamina E tem sido extensivamente estudada com respeito a sua capacidade de proteger moléculas biológicas dos efeitos da toxicidade do ferro utilizado no tratamento da anemia renal. Os efeitos observados mostram que a vitamina E pode prevenir a maioria dos danos mediados pelo ferro nos sistemas *in vivo* e *in vitro*. Nos pacientes em HD, a administração de 1200U/dia atenuou a extensão da lipoperoxidação (ROOB et al., 2000).

A vitamina E administrada por via oral ou através de membranas de diálise enriquecidas com esta, tem mostrado ser efetiva no combate ao estresse oxidativo, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares nos pacientes renais crônicos em diálise (THABET & CHAN, 2006).

O estudo SPACE realizado por Boaz et al. (2000) observou uma redução de 54% nos fatores de risco para as doenças cardiovasculares em pacientes que receberam 800 IU/dia de vitamina E, acompanhados por um período de 519 dias; deste estudo, participaram pacientes de seis centros de diálise.

Nakamura et al. (2003) demonstraram que membrana enriquecida com vitamina E preveniu a aterosclerose acelerada em pacientes em HD, o que foi evidenciado por significativa redução da espessura da camada médio-íntima da carótida.

Apesar de haver muitos indícios dos benefícios do uso da vitamina E, os autores não são unânimes em indicar o seu uso. O estudo HOPE, realizado em 9541 pacientes, falhou ao tentar provar os benefícios do uso da vitamina E em pacientes em hemodiálise. A dose de vitamina E utilizada nesse estudo foi de 400 IU/dia por um período de quatro anos e meio. Não foram observadas diferenças significativas na incidência de eventos cardiovasculares nos participantes. Não foram observados efeitos adversos com o uso da vitamina E (YUSUF et al., 2000).

Os estudos sobre vitamina E são abundantes e a variabilidade de resultados também. A variabilidade da natureza e dosagem, o estágio da doença, o tempo de terapia, a idade dos pacientes e o grau da insuficiência renal provavelmente contribuem para as grandes diferenças obtidas nos estudos (THABET & CHAN, 2006).

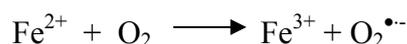
1.6 Suplementação de ferro: riscos e benefícios

O uso da eritropoetina como recurso para o tratamento da anemia em pacientes que realizam HD tem sido considerado um dos maiores avanços no cuidado com esses pacientes. Contudo esse tratamento é frequentemente moderado por induzir à depleção de ferro.

Estudos clínicos mostraram que a terapia com ferro não apenas melhora eritropoiese como também resulta em uma diminuição na quantidade de eritropoetina administrada (LIM et al., 1999). Assim, na prática, a suplementação de ferro pode ser considerada quase obrigatória no objetivo de impedir a anemia resultante da hemólise crônica nos doentes renais crônicos tratados com eritropoetina (CRISTOL et al., 1997). Porém, sabe-se que o ferro está envolvido como um catalisador na geração de EAO, como o tóxico radical hidroxil, e que espécies férricas podem estar envolvidas em diferentes etapas da lipoperoxidação. Alguns estudos mostram um aumento do estresse oxidativo nos pacientes em hemodiálise que recebem eritropoetina e terapia com ferro quando comparados com os pacientes não submetidos a esse tratamento. O dano oxidativo resultante pode contribuir para a alta incidência de aterosclerose nos pacientes em estágio final da doença renal que realizam hemodiálise (LIM et al., 1999).

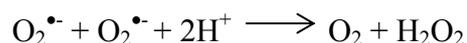
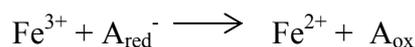
O dano mediado por radicais livres em diferentes tecidos é aceito como mecanismo fundamental para a ocorrência de diversas doenças crônicas. As alterações na estrutura das células, causadas por sobrecarga de ferro, têm sido fundamentalmente relacionadas com o dano mediado por radicais livres. A estrutura química do ferro e sua capacidade de doar um elétron fazem com que as suas reações tenham um grande papel na produção e metabolismo dos radicais livres nos sistemas biológicos (FRAGA & OTEIZA, 2002).

O íon ferroso (Fe^{2+}) tem a capacidade de reduzir o oxigênio a radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), uma reação que, em organismos aeróbios, é consumada em níveis celular e extracelular (Reação 8).



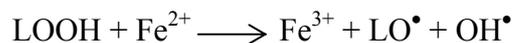
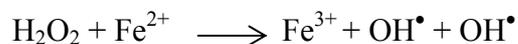
REAÇÃO 8 - Reação de redução do oxigênio à radical superóxido, por ação do íon ferroso.

Ambos, íon ferroso não quelado e diferentes formas de íon ferroso quelado, podem catalisar essa reação. Vários redutores (ascorbato, compostos tiólicos, ânion superóxido), podem restaurar íon férrico (Fe^{3+}), resultando na produção de ânion superóxido. Duas moléculas de ânion superóxido podem dismutar espontânea ou enzimaticamente rendendo oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Reação 9).



REAÇÃO 9 - Restauração do íon férrico. Dismutação de duas moléculas de ânion superóxido, formando oxigênio e peróxido de hidrogênio. (A_{red} – antioxidante reduzido; A_{ox} – antioxidante oxidado).

Íon ferroso pode catalisar a decomposição de peróxidos, resultando em radical hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio, ou radicais alcoxil, se o substrato da reação é um peróxido orgânico (LOOH) (Reação 10).



REAÇÃO 10 - Reação onde íon ferroso catalisa a decomposição de peróxidos resultando em radical hidroxil (OH^{\bullet}) ou alcoxil (LO^{\bullet}).

Assim, a participação do ferro é essencial na produção do radical hidroxil que pode, subseqüentemente, iniciar a lipoperoxidação ou oxidar diversas moléculas presentes

nos sistemas biológicos. O ferro também é reponsável pela propagação de radicais livres pela decomposição de peróxidos.

A relevância das reações catalisadas por ferro in vivo está restrita e negligencia a avaliação do ferro catalítico livre. Todavia, aumento na geração de superóxido pode favorecer liberação de ferro da ferritina e de proteínas heme (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Além dos fatores de risco conhecidos, quando comparados com a população em geral, os doentes renais crônicos apresentam uma série de outros fatores para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares, como anemia, hiperhomocisteinemia, calcificação vascular, como também inflamação e estresse oxidativo. A sobrecarga de ferro, devido à suplementação utilizada para o tratamento da anemia renal, tem sido sugerida como um fator adicional para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares nos doentes renais crônicos em hemodiálise (KLETZMAYR & HÖRL, 2002).

Um estudo realizado por Sullivan (1981), antes mesmo do surgimento da eritropoetina recombinante humana, sugeriu que a alta incidência de doenças cardíacas em homens e mulheres após a menopausa, estaria relacionada a altos estoques de ferro. Segundo o autor, as doenças do miocárdio estariam relacionadas à sobrecarga no armazenamento de ferro e isso era explicado pelo aumento no acúmulo de ferro com a idade. Além disso, o autor preconizava que as mulheres após a menopausa, por não perderem ferro através da menstruação, passariam a acumular ferro de forma similar aos homens e isto faria com que ocorresse um aumento nos fatores de risco para doenças cardiovasculares nessas mulheres. O argumento principal de Sullivan era que a deficiência de ferro teria um efeito protetor contra doenças cardíacas.

Após o estudo de Sullivan, diversos autores observaram evidências de que grandes estoques de ferro realmente aumentavam o risco de doença cardiovascular

(KIECHL et al., 1997; TUOMAINEM et al., 1998; KLIPSTEIN-GROBUSCH et al., 1999). Porém, alguns outros estudos não apresentaram resultados conclusivos. Um trabalho onde há a avaliação de vários estudos de corte demonstrou que a associação entre ferritina sérica e o risco de doença cardíaca era variável (SEMPOS & LOOKER, 2001).

São dois os mecanismos sugeridos para apontar o ferro como um fator de risco para as doenças cardiovasculares: oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e disfunção endotelial.

A disfunção endotelial é um componente conhecido na doença cardiovascular. Um estudo realizado por Duffy et al. (2001) envolvendo sujeitos controle e doença arterial coronariana, utilizando quelação do ferro com uma hora de infusão de um quelante de ferro, observou melhora da resposta do fluxo sanguíneo no antebraço em resposta à metacolina que é um agente vasodilatador endotélio-dependente. Nos indivíduos controle, esse efeito não era observado. Esses resultados são atribuídos ao ferro, sugerindo que o mesmo exacerba a deterioração da atividade do óxido nítrico no endotélio de indivíduos que apresentam aterosclerose.

A oxidação do colesterol LDL apresentou associação com os níveis de ferritina sérica e ambos tinham associação sinérgica com a progressão da aterosclerose da carótida. Os autores sugeriram que isso se dá pela ação do ferro em promover a lipoperoxidação (KIECHL et al., 1997). A importância do ferro na lipoperoxidação foi evidenciada quando se observou que homens que doaram sangue exibiam declínio da concentração de ferritina da ordem de 44% e que a velocidade de oxidação também reduzia (SALONEN et al., 1995).

Estudos clínicos mostraram que a terapia com ferro não apenas melhora a eritropoiese como também resulta em uma diminuição na quantidade de eritropoetina administrada (LIM et al., 1999; KATO et al., 2001; CHANG et al., 2002). Assim, na

prática, a suplementação de ferro pode ser considerada quase obrigatória no objetivo de impedir a anemia resultante da hemólise crônica nos doentes renais crônicos tratados com eritropoetina (CRISTOL et al., 1997). Devido a esta razão, antes de iniciar tratamento com ERH, deve ser realizada a avaliação do metabolismo do ferro através da mensuração de ferritina sérica e da saturação da transferrina. Esses parâmetros devem continuar sendo monitorizados durante o tratamento. Pois, é bastante oneroso e seus resultados devem ser otimizados.

A deficiência de ferro tem sido observada em doentes renais independente da função renal. A deficiência de ferro na doença renal crônica pode ser em parte explicada pela redução da ingestão de ferro resultante das restrições dietéticas a que esses pacientes são submetidos e pela anorexia que os acomete nas fases mais avançadas da doença. Além disso, recentemente tem sido descrito o papel da hepcidina no metabolismo do ferro. Esse peptídeo é produzido no fígado por estímulo de citocinas pró-inflamatórias impedindo a absorção intestinal de ferro e também a liberação dos estoques orgânicos (WEISS & GOODNOUGH, 2005).

A suplementação com ferro é praticamente obrigatória sendo necessária sua administração, em geral, por via parenteral. Por essa via, é proposto administração de 100 mg de ferro intravenoso a cada diálise por nove a dez sessões, medindo-se os parâmetros do metabolismo do ferro após duas semanas e repetindo se necessário. Quando a suplementação de ferro é feita por via oral, pelo menos 200 mg de ferro devem ser administrados diariamente, em doses divididas e fora das refeições. Uma vez alcançado o hematócrito-alvo, as doses de manutenção ficam entre 25 e 100 mg/semana em pacientes de HD (BARROS et al., 1999).

A infusão de 100 mg de ferro em voluntários saudáveis estava associada ao aumento da geração de superóxido no sangue acompanhada de uma redução significativa da vasodilatação mediada pelo fluxo (ROOYAKKERS et al., 2002).

A terapia com eritropoetina e apropriada administração de ferro são importantes aspectos para gerenciar a anemia no estágio final da doença renal. Atingindo níveis alvos de 11 a 12 g/dl e otimização do balanço de ferro melhorou resultados clínicos e aumentou a qualidade de vida dos pacientes. Contudo, os níveis excessivamente altos de ferro podem induzir o aumento de estresse oxidativo e o risco de doença cardiovascular (BESARAB, 1999).

O aumento da aterosclerose e conseqüente aumento da morbidade e mortalidade por doença cardiovascular são importantes problemas clínicos em pacientes com doença renal em diálise. Mortalidade por doença cardiovascular dos pacientes em diálise é de 9% ao ano, isto é, 30% maior que a população em geral (SARNAK et al., 2003).

A fisiopatologia de eventos cardiovasculares na uremia é multifatorial, mas a aterosclerose acelerada parece ter papel central na disfunção cardiovascular. O envolvimento do estresse oxidativo tem sido usado para formulação de hipóteses que visam explicar a alta incidência das doenças cardiovasculares em doentes renais crônicos (CLERMONT et al., 2000; LOUGHREY et al., 1994).

A aterosclerose é uma doença multifatorial. A oxidação, e em especial a modificação das proteínas de baixa densidade (LDL) dentro das paredes das artérias e seu ataque por macrófagos, tem sido postulado, como sendo um importante aspecto na aterogênese (STOCKER & KEANEY, 2004). Estudos têm mostrado níveis elevados de oxidação de lipídios e proteínas em indivíduos humanos com níveis avançados de lesões ateroscleróticas (STOCKER & KEANEY, 2004; UPSTON et al., 2002).

Apesar das doenças cardiovasculares terem etiologia multifatorial, os pacientes apresentam associação entre dislipidemia e aterosclerose acelerada. Um estudo analisou a dislipidemia em pacientes em hemodiálise; os autores observaram alta prevalência de dislipidemia, estando presente em 63% de 1824 pacientes avaliados (COFAN et al., 2006).

Pacientes em diálise sofrem de um distúrbio no metabolismo lipídico e isso contribui para realçar a aterosclerose e aumentar a mortalidade cardiovascular nessa população. A dislipidemia nessa população é caracterizada por composição anormal de lipoproteínas e apolipoproteínas. A concentração de lipoproteínas de alta densidade normalmente está reduzida enquanto a concentração de triglicerídios e ou lipoproteínas de baixa densidade e lipoproteínas de densidade intermediária está aumentada (DIEPEVEEN, et al., 2005).

As evidências sobre a hipótese oxidativa da aterosclerose são consistentes. A modificação oxidativa da LDL é importante, e possivelmente obrigatória no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. As defesas naturais (endógenas) podem ser insuficientes. Teoricamente, os antioxidantes poderiam exercer efeitos favoráveis, tanto nas lesões iniciais como nas lesões intermediárias e avançadas da doença arterial coronariana, com as respectivas implicações clínicas a curto, médio ou longo prazo.

1.6 Hipótese

A insuficiência renal crônica é caracterizada por um estado pró-oxidante, demonstrado por aumento nos níveis de lipoperoxidação e dano às proteínas, e pela diminuição de antioxidantes no plasma e eritrócitos desses pacientes.

O tratamento da anemia renal, realizado com eritropoetina, faz com que uma suplementação de ferro seja necessária para a otimização desse tratamento. Sabe-se que o ferro está envolvido como um catalisador na geração de espécies ativas de oxigênio, como

o tóxico radical hidroxil. Assim, a suplementação de ferro pode resultar em aumento do dano oxidativo sistêmico nesses pacientes.

Baseado nestes dados, o estudo testou a hipótese de que a suplementação de ferro realizada para tratamento da anemia renal induz aumento do estresse oxidativo sistêmico com conseqüente aumento no dano a lipídios e proteínas, e que a administração de um antioxidante clássico como a vitamina E pode prevenir essas alterações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do ferro no estresse oxidativo sistêmico em doentes renais crônicos que realizam HD, submetidos à suplementação com ferro para tratamento da anemia renal, associado ou não à suplementação de vitamina E.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a repercussão de uma sessão de hemodiálise sobre marcadores periféricos de estresse oxidativo dos doentes renais.

Determinar o dano oxidativo sistêmico em doentes renais crônicos em HD através de medidas de LPO por quimiluminescência e dano às proteínas através da técnica das carbonilas, determinado pela suplementação de ferro e pela suplementação de ferro associada à vitamina E.

Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) em eritrócitos frente à suplementação de ferro e suplementação de ferro associada à vitamina E.

Estudar o efeito da suplementação de ferro e de ferro associada à vitamina E nos metabólitos do NO (nitritos e nitratos).

Avaliar o perfil inflamatório dos pacientes submetidos a suplementação com ferro e verificar se há alteração deste com o uso de vitamina E, através da mensuração da proteína reativa C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Indivíduos

Participaram do estudo pacientes renais crônicos que realizavam HD e que tinham indicação clínica para suplementação de ferro. A amostra foi composta de 21 pacientes, 7 mulheres e 14 homens, com média de idade de $53,76 \pm 17,12$ anos. Os pacientes estudados realizavam HD na Unidade de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, na Clínica Renal do Hospital Divina Providência de Porto Alegre e na Clínica Renal Santa Lúcia do Hospital Santa Lúcia da cidade de Cruz Alta.

Os participantes realizavam três sessões semanais de HD com duração média de $4,18 \pm 0,32$ h. O tempo em que esses pacientes estavam em tratamento hemodialítico variou bastante de paciente para paciente. A média de tratamento com HD nos pacientes estudados foi de 41 ± 40 meses. Todos os pacientes estudados realizavam HD utilizando o mesmo tipo de membrana de diálise: celulose modificada (acetato de celulose), que é uma membrana biocompatível.

Utilizou-se como critérios de exclusão: doenças hepáticas; processos inflamatórios crônicos e doença cardíaca conhecida. Além desses fatores a falta de adesão ao protocolo também foi utilizado como critério de exclusão do estudo.

A causa da IRC nos pacientes avaliados era: hipertensão arterial sistêmica; glomerulopatias; diabete melito; rins policísticos; lupus eritematoso sistêmico; e, causa indeterminada.

O estudo do efeito da suplementação de ferro (sacarato de hidróxido de ferro III) foi realizado utilizando um protocolo habitual de administração. O protocolo consistiu na administração de 100 mg de ferro intravenoso a cada quinze dias. A administração de ferro foi realizada sempre ao final da sessão por via endovenosa. Este protocolo é normalmente utilizado em pacientes com hematócrito alvo (33 – 36%); nestes, o objetivo é potencializar o efeito da eritropoetina e manter o hematócrito dentro dos valores esperados.

Para a realização do estudo, utilizou-se como suplementação de ferro o sacarato de hidróxido de ferro III. Em cada tratamento, o paciente recebia uma ampola contendo 100 mg de ferro III diluído em 50 ml de soro fisiológico. O paciente recebia o tratamento sempre nos últimos trinta minutos da sessão de HD e era administrado por via endovenosa.

A suplementação com vitamina E foi realizada através de cápsulas gelatinosas, 1 ou 2 cada uma contendo 400 mg de acetato de tocoferol (vitamina E) da marca Roche, para dose final de 400 ou 800 mg. A forma de administração utilizada foi via oral.

Os pacientes foram avaliados em cinco sessões de HD. Em todas as sessões em que o paciente era avaliado, foi coletada uma amostra de sangue no início da sessão e outra realizada vinte e quatro horas após o final da sessão. Na primeira sessão, porém, os pacientes foram avaliados também no momento em que estavam sendo desconectados das máquinas dialisadoras, imediatamente após a hemodiálise. No total, foram realizadas 11 coletas de sangue em cada um dos pacientes avaliados.

Na primeira sessão, na qual se avaliou apenas os efeitos da HD, o paciente não recebeu nenhum tipo de intervenção com ferro ou vitamina E (avaliação 1). Na sessão subsequente, os pacientes receberam uma dose de sacarato de hidróxido de ferro III, conforme protocolo já mencionado (avaliação 2).

Para determinar os efeitos da vitamina E, os pacientes foram avaliados em três sessões diferentes. Na primeira sessão em que se avaliaram os efeitos agudos da administração da vitamina E associado ao do ferro (avaliação 3), seis a oito horas antes da HD, os pacientes receberam por via oral, 800 mg de acetato de tocoferol (vitamina E) e, durante a sessão, nova dose de sacarato de hidróxido de ferro III lhes foi administrada. Para avaliar o efeito crônico, após essa sessão, os pacientes passaram a ingerir diariamente 400 mg de acetato de tocoferol em uma das principais refeições. Após trinta dias, uma nova sessão de HD em que o paciente recebeu ferro foi avaliada (avaliação 4). Posteriormente, dobrou-se a dose de vitamina E e os pacientes passaram a ingerir diariamente 800 mg. Trinta dias após suplementação com essa nova dosagem, em uma sessão onde os pacientes receberam ferro, os mesmos foram novamente avaliados (avaliação 5) .

O projeto deste estudo foi avaliado e aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, pela Comissão Científica e pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA (anexo 1) .

Para participar do estudo, todos foram informados dos objetivos, benefícios, risco e metodologia que seria aplicada para a realização do trabalho. Antes das avaliações, todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2).

O fluxograma da execução deste experimento está representado na Figura 1.

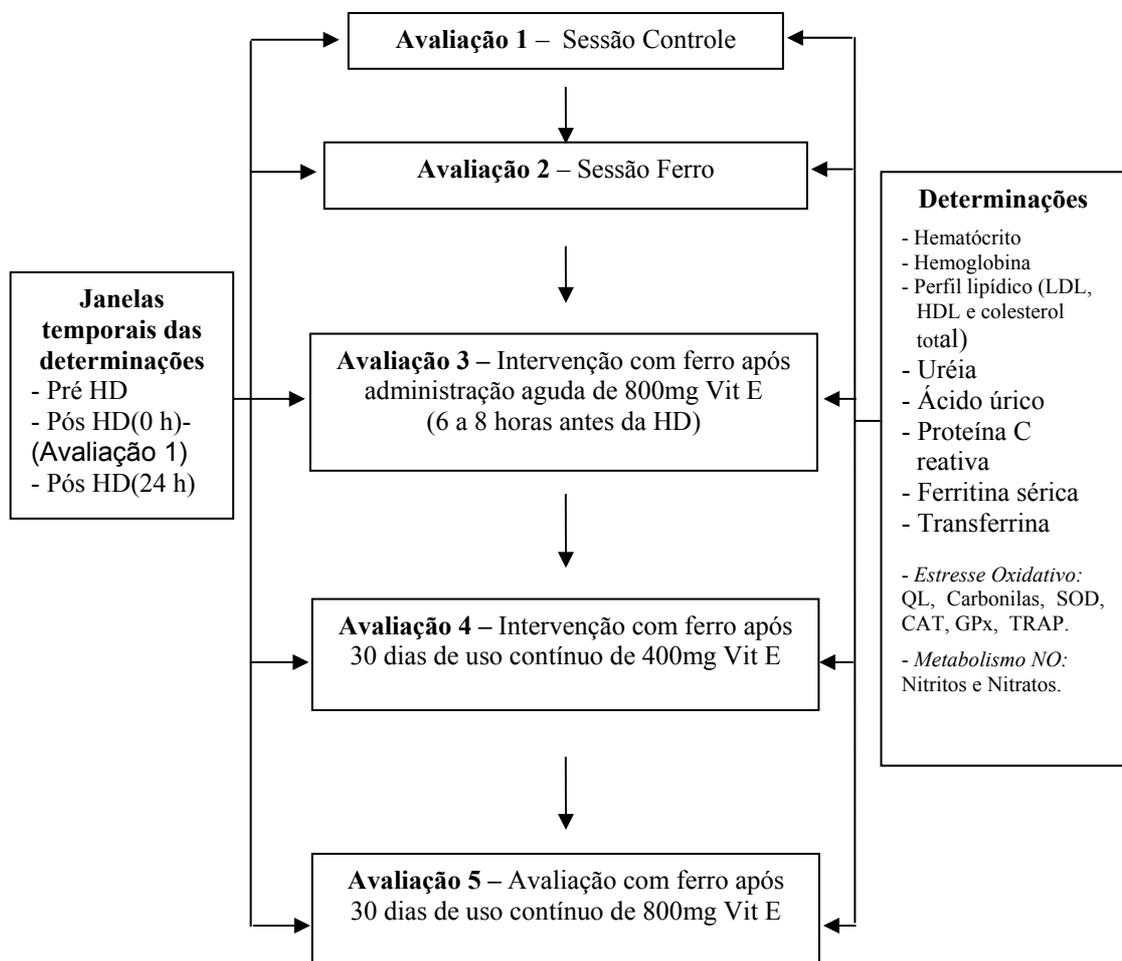


Figura 1- Fluxograma do Protocolo Experimental com as determinações previstas e janelas temporais em que foram realizadas as determinações.

3.2 Coleta Sangüínea

A coleta de sangue nos pacientes em HD foi realizada em dois momentos distintos em cada estágio de avaliação: no início da sessão de HD, quando os pacientes eram ligados às máquinas dialisadoras, e vinte e quatro horas após o término da sessão de HD no dia interdialise. As coletas foram realizadas na porção arterial da fistula arteriovenosa. Na avaliação 1, também se realizou uma coleta ao final da sessão de hemodíalise. A coleta foi realizada no momento em que os pacientes eram desconectados das máquinas dialisadoras.

Não foram realizadas coletas de sangue na primeira sessão de HD da semana. Para a realização das coletas não foi solicitado jejum.

A coleta de sangue foi realizada em todos os momentos pelas equipes de enfermagem dos diferentes centros de tratamento, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital Divina Providência de Porto Alegre e Hospital Santa Lúcia de Cruz Alta.

O sangue foi armazenado em quatro tubos diferentes: um tubo de coleta a vácuo contendo anticoagulante EDTA (4 mL), para realização de hemograma e metabolismo do ferro; dois tubos de coleta a vácuo sem aditivo (4 mL), sendo um para análises bioquímicas e outro para marcadores inflamatórios; um último tubo de coleta a vácuo contendo anticoagulante heparina (10 mL), para análise do estresse oxidativo. Logo após a coleta, as amostras de sangue foram encaminhadas aos respectivos laboratórios para análise.

As análises bioquímicas (uréia, ácido úrico), hemograma, metabolismo do ferro, perfil lipídico e proteína C reativa foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e em Cruz Alta, no Laboratório de Análises Clínicas Oswaldo Cruz. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia do Instituto de

Ciências Básicas da Saúde – ICBS – da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

As amostras de sangue dos pacientes da Clínica Renal Santa Lúcia de Cruz Alta –RS foram lavadas, preparadas para avaliações e fracionadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade de Cruz Alta – UNICRUZ. Após o preparo da amostra, as mesmas foram congeladas no Hemonúcleo dessa cidade.

3.3 Avaliação do Estresse Oxidativo

3.3.1 Preparo do Sangue para Avaliação do Estresse Oxidativo

O preparo do sangue para avaliação do estresse oxidativo foi realizado no dia da coleta.

Após a coleta, o sangue armazenado em tubo, com anticoagulante heparina, era centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o plasma retirado e fracionado em tubos tipo Eppendorff de 2,0 mL e armazenado à temperatura de -80°C . O plasma foi utilizado para avaliação da oxidação de proteínas (método das carbonilas) e para determinação de nitratos e nitritos. Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%), por três vezes, colocando-se uma quantidade de glóbulos vermelhos em um tubo tipo eppendorff e acrescentando-se a mesma quantidade de soro fisiológico; em seguida, centrifugou-se a 3000 rpm por cinco minutos; no final da centrifugação, retirou-se o sobrenadante descartando-o; repetiu-se o procedimento por três vezes.

Após a lavagem dos eritrócitos, uma parte destes (75 μL) foi diluída em 500 μL de soro fisiológico para medida de lipoperoxidação e concentração de hemoglobina. Essas medidas foram realizadas no dia da coleta. Os eritrócitos restantes foram fracionados em tubos tipo Eppendorff e armazenados em freezer a -80°C . Os eritrócitos foram

fracionados da seguinte forma: 100 μL de glóbulos vermelhos lavados acrescentados de 1 mL de solução de ácido acético 1 mmol/l e sulfato de magnésio 4 mM; as amostras foram utilizadas para análise de proteínas e atividade das enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase.

3.3.2 Dosagem de Hemoglobina

A hemoglobina foi dosada nas amostras de sangue preparadas com soro fisiológico, utilizadas para mensuração da lipoperoxidação. Para análise, utilizou-se uma mistura de cianetos, obtendo-se assim o reagente de Drabkin, que interage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, medida em espectrofotômetro. O espectrofotômetro utilizado neste trabalho foi da marca Varian, modelo Cary.

Para as dosagens, colocou-se, em um tubo de ensaio, 5 mL da solução de Drabkin e 20 μL de amostra; deixando reagir por cinco minutos e a absorbância lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 546 nm.

Os resultados são expressos em miligramas por mililitros ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Solução de Drabkin:

0,85 mL de KCN 9 mmol/l;

6,6 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,9 mmol/l;

q.s.p. 10 mL água destilada.

3.3.3 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH

Quimiluminescência é um dos métodos mais sensíveis para medir LPO. O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética, o hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH), à amostra sangüínea, avaliando a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização desse tipo de teste consiste no fato de que os

hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo.

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com circuito de coincidência desconectado, utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 4 mL de uma solução reguladora de KCl 140 mmol/l, fosfatos 20 mmol/l, pH 7,4, à qual foram adicionados 10 µL de eritrócitos diluídos em soro fisiológico. Após, foi realizada uma leitura inicial e considerada a emissão de luz basal. O hidroperóxido de tert-butil, na concentração de 400 mmol/l, foi adicionado ao meio de reação (30 µL), para uma concentração final de 3 mmol/l. Foi medida, então, a emissão de luz e, desta, descontada a emissão basal para cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de hemoglobina (LLESUY et al.,1990; GONZALEZ-FLECHA et al.,1991).

3.3.4 Mensuração de Proteínas

Para mensuração de proteínas, foi utilizado o protocolo descrito por Lowry et al., (1951), que usa como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/ml. Uma curva de calibração foi construída a partir da albumina bovina, calculando-se um fator de correção médio, utilizado para posterior cálculo da concentração de proteínas.

Foram utilizados os reagentes:

Reativo de Folin Ciocalteau diluído em água destilada na proporção 1:3;

Reativo A: NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1 N;

Reativo B1: CuSO₄.5H₂O (sulfato de cobre) 1%;

Reativo B2: $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2%.

Reativo C, composto por, 50 mL do reativo A, acrescentado de 0,5 mL do reativo B1 e 0,5 mL do reativo B2;

Para realização do experimento, procedeu-se da seguinte maneira: em tubos de ensaio, colocaram-se 20 μL de amostra, glóbulos vermelhos, previamente lavados e preparados para análise de atividade enzimática, em 0,78 mL de água destilada e 2 mL de reativo C preparado no momento do experimento. Após dez minutos, adicionou-se ao tubo 0,2 mL do reativo Folin Ciocalteu, agitou-se e, após 30 minutos, procedeu-se à realização da leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 625 nm.

Foram realizadas duplicatas para todas as amostras, sendo utilizada, para fins de cálculo, a média das absorbâncias obtidas nas duas leituras.

3.3.5 Superóxido Dismutase

A técnica utilizada para determinação da SOD baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O radical superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a auto-oxidação do pirogalol.

Através dessa técnica, não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, por isso, utiliza-se a quantidade em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, que pode ser detectado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50 mmol/l; EDTA na concentração de 1 mmol/l em pH 8,2), pirogallol 24 mmol/l (em ácido clorídrico a 10 mmol/l) e catalase a 30 μ mol/l. Para se obter o resultado em unidades de SOD, necessita-se de um fator de calibração, para isso foi construída uma curva padrão com uma solução de SOD comercialmente disponível, em concentrações conhecidas. Assim, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da auto-oxidação em unidades de enzima.

O ensaio foi realizado da seguinte maneira: colocou-se em uma cubeta 988 μ L de tampão Tris, 4 μ L de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro, foi adicionado 8 μ L de pirogallol à cubeta, realizando a leitura da mesma. Dessa forma, obteve-se o máximo de oxidação da substância. Esta medida é muito importante para posterior cálculo da percentagem de inibição causada pela SOD presente na amostra. Com a amostra, procedeu-se da mesma forma, apenas com reajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de amostra adicionada, tendo sempre um volume final de 1 mL. Os resultados são expressos em U SOD/mg proteína.

3.3.6 Catalase

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. Sendo assim, a atividade da enzima pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio.

Esse teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, já que este é o comprimento de onda em que há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização deste ensaio devem ser utilizadas cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual são realizadas as medidas.

Para o experimento, foram utilizados os reagentes: solução de tampão fosfato de sódio 50 mmol/l (pH 7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/l.

Em cubeta de quartzo, colocou-se 975 µL do tampão fosfato e 10 µL de amostra de sangue previamente preparada; a cubeta colocada no espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, adicionou-se 15 µL de peróxido de hidrogênio, sendo monitorizada a diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado, ou seja, a decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados são expressos em pmoles por mg de proteína (AEBI, 1984).

3.3.7 Glutationa Peroxidase (GPx)

A enzima glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Logo, sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação de GPx.

A amostra foi preparada previamente adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudoperoxidase da hemoglobina, transformando-a em cianometahemoglobina.

O meio de reação contém: solução tampão fosfato 140 mM e EDTA 1 mmol/l, (pH 7,5), NADPH 0,24 mmol/l; azida sódica 1 mmol/l, utilizada para inibir a atividade da catalase; GSH 5 mmol/l; glutathione redutase (GR) 0,25 U/ml e, por fim, hidroperóxido de tert-butil 0,5 mmol/l.

Para medida da GPx, tomou-se glóbulos vermelhos previamente preparados e determinou-se a concentração de hemoglobina por meio do reativo de Drabkin (8,5% de KCN 9 mmol/l e 66% de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9 mmol/l). Para isso, misturou-se 100 µL de eritrócitos com 1mL de Drabkin e lê-se a 546 nm.

Uma vez conhecida a concentração de hemoglobina, tomou-se, para cada 0,6 mg/mL de hemoglobina, 100 µL de solução transformante para converter toda a hemoglobina em cianometahemoglobina a fim de inibir a atividade peroxidante da hemoglobina (50% de KCN 9 mmol/l e 50% de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9 mmol/l). Na cubeta, colocou-se, 2,15 mL de tampão (EDTA 1 mmol/l em fosfato de potássio 100 mmol/l, pH= 7,7), 100 µL de NADPH (10 mmol/l), 150 µL de hidroperóxido de tert-butil (10 mmol/l e 50 µL de glutatona redutase). Para obter a linha de base, a absorbância foi lida a 340 nm por 1 minuto.

Adicionou-se 50 µL de glutatona reduzida (100 mmol/l em ácido metafosfórico a 5%) e lêu-se por mais 1 minuto. Logo após, adicionou-se 500 µL da amostra transformada e lêu-se novamente por mais 1 minuto.

A atividade da GPx é expressa em µmoles/min/mg de proteínas (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

3.3.8 Oxidação de Proteínas – Método das carbonilas

A avaliação das carbonilas foi realizada de acordo com o método descrito por Reznick & Packer (1994). O método consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que podem ser medidas espectrofotometricamente. É uma técnica com alta reprodutibilidade podendo detectar níveis de carbonilas em vários sistemas.

Para a realização do experimento foram utilizados os reagentes:

Guanidina (PM 95,53): 5,73 g em 10 mL de ácido HCl (2,5M) pH 2,5;

2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH): 19,8 mg em 10 mL de ácido HCl 2,5 mol/l;

TCA 20% P/V;

TCA 10% P/V;

Etanol – acetato de etila 1:1 (V/V).

Para realização da curva de albumina, utilizou-se:

0,2 mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 0,5 mg/mL;

0,4 mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 1 mg/mL;

0,6 mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 1,5 mg/mL.

Primeiro colocou-se 0,8 mL de DNPH com 0,2 mL de plasma para que ocorra reação do DNPH com as carbonilas da amostra. Para cada amostra, utilizou-se outro tubo onde se mede a proteína total da amostra. Esse tubo é utilizado como branco, e as concentrações utilizadas são as mesmas utilizadas para medida das carbonilas. No tubo, colocou-se 0,2 mL de amostra e 0,8 mL de HCl 2,5 mol/l. Os tubos foram incubados por uma hora, no escuro e agitados a cada quinze minutos.

A partir da primeira etapa, descrita acima, as demais foram realizadas da mesma forma, tanto para os tubos onde se utilizou DNPH quanto para os tubos onde foram avaliadas as proteínas.

Após, é adicionado 1 mL de solução de TCA 20% em ambos os tubos. Colocou-se os tubos no gelo por 10 minutos e centrifugou-se por cinco minutos em centrífuga refrigerada a 3000 rpm. O precipitado é utilizado, e o sobrenadante descartado.

Em seguida, acrescentou-se ao precipitado 0,8 mL de TCA 10% e agitou-se mecanicamente com bastão de vidro. Centrifugou-se por cinco minutos. Finalmente, o precipitado foi lavado por três vezes com 0,8 mL de etanol – acetato de etila, para remover o DNPH livre e lipídios contaminantes.

O precipitado final foi dissolvido em 0,4 mL de guanidina 6 M e agitado por 10 minutos a 37°C. O material insolúvel foi removido por centrifugação adicional. O sobrenadante lido em espectrofotômetro a 360 nm.

No tubo onde se mede a proteína total da amostra, lêu-se em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm.

Para calcular proteína, utilizou-se uma curva padrão de albumina bovina, dissolvida em guanidina 6 mol/l e medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm.

3.4 Avaliação do Metabolismo do Óxido Nítrico

3.4.1 Determinação de Nitratos e Nitritos

Os níveis de nitratos no plasma foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess, pelo método descrito por Granger et al. 1999. Aliquotas de 50 µL foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por trinta minutos em temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado é então analisado pela reação deste com o reagente de Griess. Forma-se um composto corado medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

A quantificação dos níveis de nitratos foi realizada utilizando-se os reagentes: reativo de Griess (1 g de sulfanilamina, 0,1 g de naftilendiamina, 2,3 mL de ácido ortofosfórico 85%, 97,7 mL de água); Tris 1 mol/l, pH 7,5; NADPH 0,02 mmol/l; glicose 6-fosfato (G6P) 5 mmol/l; glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 10 U/mL e nitrato redutase (NR) 1,0 U/mL.

No meio de reação, foram adicionados 50 µL de amostra, 10 µL de NADPH, 7 µL de Tris, 23 µL de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 µL de NR. A mistura foi então incubada à temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Após, foram adicionados

100 µL do reagente de Griess, incubado à temperatura ambiente, sob agitação, por mais 10 minutos e a absorbância lida a 540 nm. Os resultados foram avaliados comparando-os com uma curva padrão feita utilizando nitrato de sódio 1 mmol/l e os valores são expressos em µmol/L (GRANGER et al., 1999).

3.5 Avaliação Complementar

-Hematócrito (%)- Método: Impedância e absorbância da luz. Equipamento: Pentra 120/ Pentra Retic/120.

-Hemoglobina (g /dL)- Método: Impedância e absorbância da luz. Equipamento: Pentra 120/ Pentra Retic/120.

-Ferritina sérica (ng/ mL) – Método: Eletroquimioluminescência. Equipamento: Elecsys 2010.

-Transferrina (mg/dL) – Método:Imunoturbidimetria. Equipamento: Ádvia 1650.

-Colesterol total (mg/dL) – Método: Enzimático Colorimétrico. Equipamento:Ádvia 1650.

-LDL(mg/dL) – Método: Equação de Friedewald. Equipamento:Ádvia 1650.

-HDL(mg/dL) – Método: Direto Inibição Seletiva. Equipamento:Ádvia 1650.

-Uréia (mg/dL) – Método: Enzimático UV. Equipamento: Ádvia 1650.

-Ácido Úrico (mg/dL) – Método: Enzimático Colorimétrico. Equipamento: Ádvia 1650.

-Proteína reativa C (mg/L) – Método: Nefelometria. Equipamento: BN2 Behring.

3.6 Análise Estatística

Inicialmente, os dados obtidos para as diversas variáveis foram submetidos à análise de variância. Quando o teste F da análise de variância, englobando as variáveis com variância homogênea, indicou significância ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. Para comparação dos dados obtidos antes e

após suplementação com ferro, utilizou-se o teste t de Student Pareado, sendo consideradas significativas diferenças com $p < 0,05$ (nível de significância de pelo menos, 95%). Para análise dos dados foi utilizado o programa computacional SAS (SAS, 1989). Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação 1 - Sessão Controle

A apresentação dos resultados será realizada em cinco momentos distintos. No primeiro, denominado Sessão Controle, serão apresentados os resultados encontrados a partir da avaliação de uma sessão de hemodiálise (HD) onde os pacientes não receberam nenhuma intervenção com ferro e ou vitamina E. Para que a avaliação pudesse ser contabilizada, os pacientes não podiam apresentar nenhuma intercorrência durante o período em que estavam sendo avaliados, ou seja, desde o início da sessão de HD até 48 horas após a realização da mesma, e instantes antes da realização de uma nova sessão de HD.

Os valores encontrados para a uréia e ácido úrico nos diferentes momentos da avaliação 1 - Sessão Controle estão apresentados na Figura 2. Pode-se observar a redução significativa da concentração de uréia (mg/dL), após sessão de HD (Pós HD), quando comparada com os valores encontrados antes da HD (Pré HD). Este comportamento também foi observado para o ácido úrico (mg/dL), demonstrando a efetividade da hemodiálise em remover esse catabólitos. Após a HD, observou-se aumento crescente nos níveis de uréia e ácido úrico. Após 24h (Pós HD 24h), os níveis de uréia já eram significativamente superiores aos observados após a sessão de HD, e 48h após a HD (Pós HD 48h), os níveis de uréia eram ainda maiores. As avaliações realizadas após a HD, também foram significativamente superiores para o ácido úrico. O aumento crescente da

concentração desses catabólitos no sangue dos pacientes é resultado da insuficiência renal apresentada por esses indivíduos.

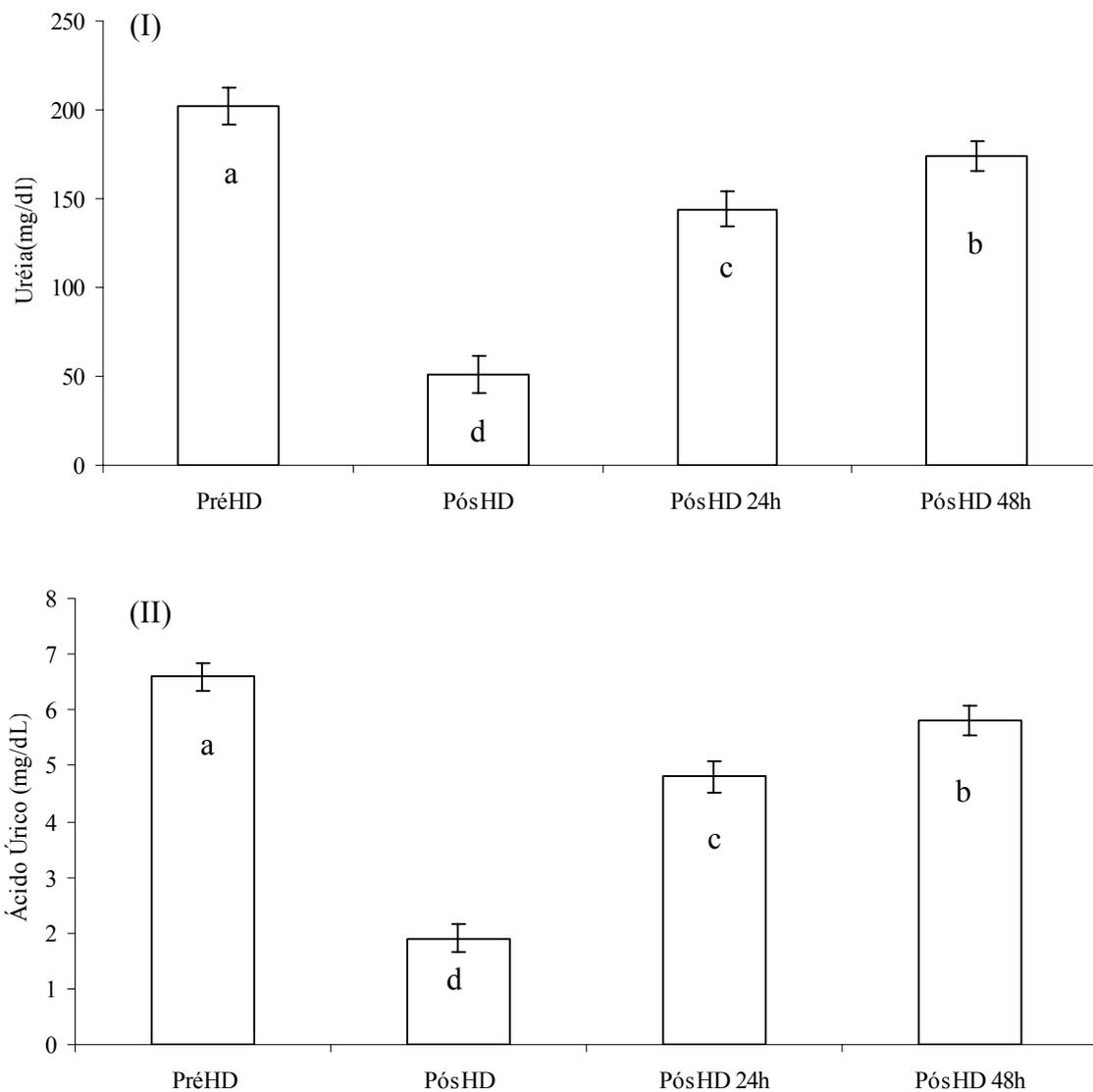


FIGURA 2 – Concentração de uréia (I) e de ácido úrico (II) em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise. Em (I) e (II), colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

A Figura 3 apresenta os dados obtidos na avaliação 1, sessão controle, para a lipoperoxidação avaliada através da quimiluminescência e para a oxidação de proteínas avaliada pelas carbonilas. Ambas as avaliações são medidas de dano oxidativo a lipídios e proteínas, respectivamente.

Analisando os dados apresentados na figura 3, observa-se que os valores da QL (cps/mg de hemoglobina) não foram modificados pela sessão de HD pelo período de 48 horas. Nesta figura, observa-se também que os níveis de carbonilas (nmol/mg de proteína) no plasma dos doentes renais crônicos, avaliados durante sessão de HD onde os mesmos não receberam nenhum tipo de intervenção, não apresentaram alteração significativa após a sessão e que esses valores não se modificaram num período de 48 horas.

Portanto, não foi observado aumento nos níveis de lipoperoxidação nem nos níveis de oxidação de proteínas até 48 horas após uma sessão de HD.

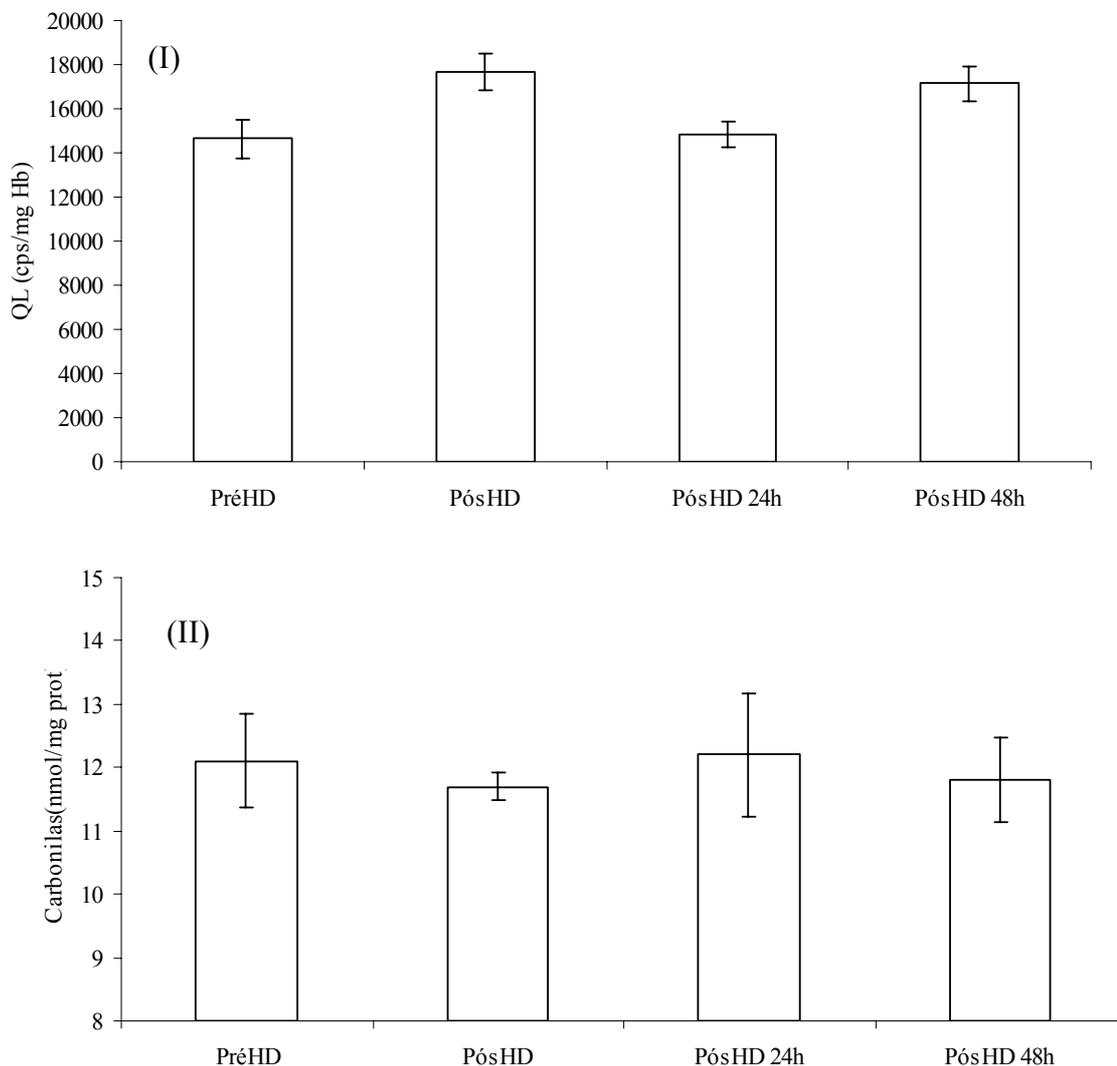


FIGURA 3 – Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas medida por carbonilas (II) em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise. Em (I) e (II), diferenças não significativas pelo teste F da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

Avaliou-se o sistema antioxidante de defesa enzimático através da mensuração da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). Os resultados encontrados para as enzimas antioxidantes CAT e SOD respectivamente, estão mostrados na Figura 4.

A atividade da enzima antioxidante catalase (pmol/mg de proteína), avaliada por um período de até 48 horas após sessão de HD, não apresentou variação significativa.

Os dados referentes à enzima superóxido dismutase (U/ mg de proteína), mostram que houve um aumento significativo de sua atividade ao final da sessão de HD (Pós HD), quando comparados com os valores obtidos antes da sessão de HD (Pré HD). Os valores para SOD, observados 24 horas após HD (Pós HD 24h) e 48 horas após a HD (Pós HD 48h), foram significativamente mais baixos que os observados imediatamente após a sessão de HD, mas foram superiores aos encontrados na coleta de sangue realizada antes da sessão de HD. Esses resultados evidenciam que houve aumento da atividade da SOD e que essa atividade se manteve acima do observado antes de o paciente ser submetido à HD.

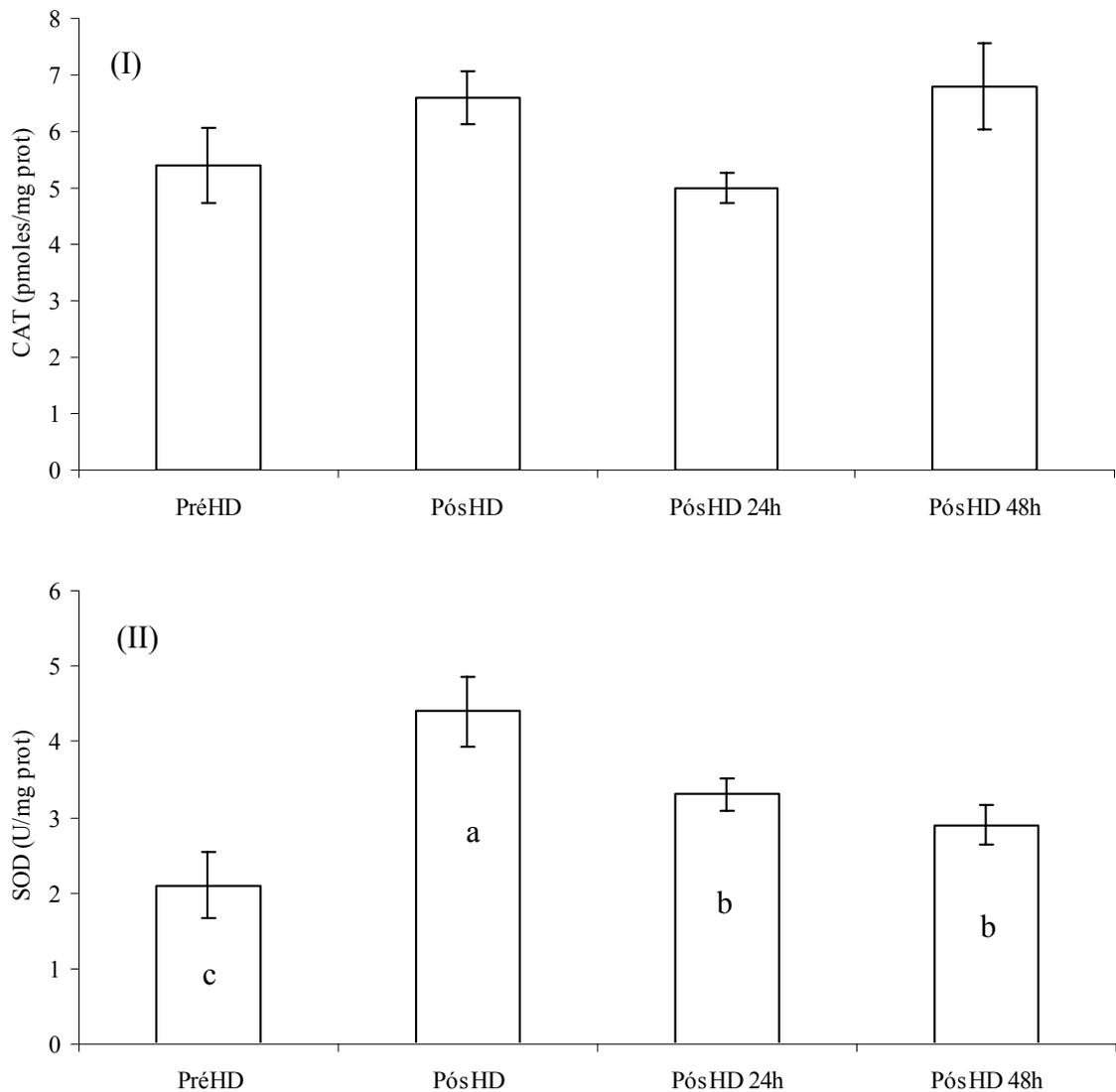


FIGURA 4 – Atividade das enzimas antioxidantes, Catalase-CAT (I) e Superóxido Dismutase-SOD (II), em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise. (I) Diferenças não significativas pelo teste F da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade do erro. (II) Colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

A atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) apresentou redução da sua atividade imediatamente após a HD (Pós HD), e essa redução se manteve após 24 horas (Pós HD 24h). A redução apresentada não foi estatisticamente significativa quando comparada à atividade da GPx no início da HD (Pré HD). Porém, quando se comparam os valores obtidos após HD e 24h após HD com a atividade da GPx 48h após a HD (Pós HD 48hs), constatou-se que a atividade da enzima se manteve reduzida até 24h e que, após esse período, a atividade da mesma voltou a atingir os valores encontrados no início da sessão de HD, dados apresentados na Figura 5.

Se forem analisados os dados referentes à avaliação 24h após a HD, observa-se que a atividade da enzima superóxido dismutase está significativamente aumentada e a atividade da enzima glutaciona peroxidase e da catalase está reduzida, porém não significativamente, quando comparada com os dados encontrados para cada uma delas antes da HD.

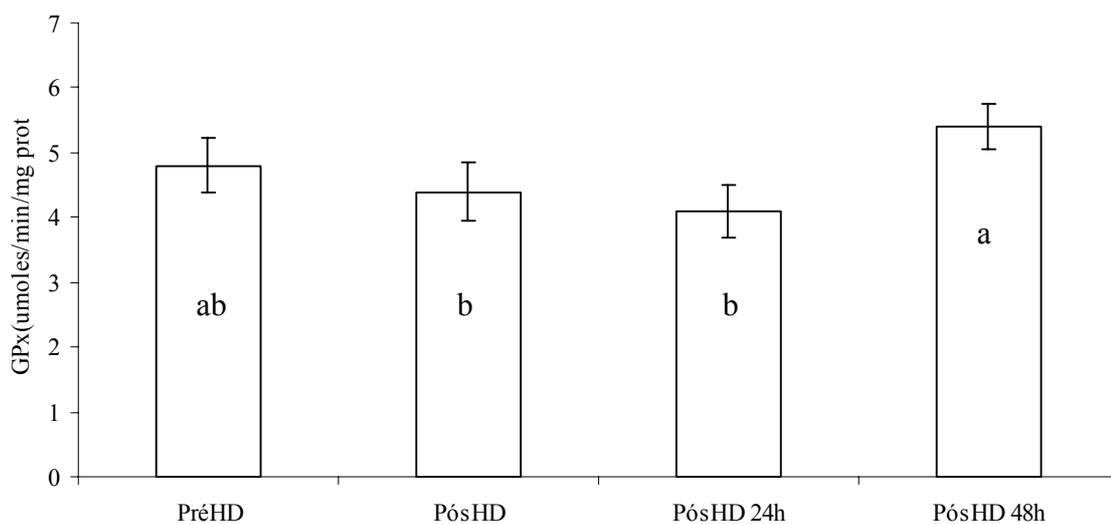


FIGURA 5 – Atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx) em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise. Colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média.

Além da avaliação de espécies ativas de oxigênio, foram efetuadas medidas relativas ao metabolismo do óxido nítrico (NO), uma espécie ativa de nitrogênio.

Os valores dos níveis de nitritos e nitratos encontrados no plasma dos doentes renais avaliados estão apresentados na Figura 6. Não houve variação significativa dos níveis de nitratos nos diferentes tempos de avaliação.

Quando se observam as colunas que representam os níveis de nitritos no plasma dos indivíduos avaliados, verifica-se que houve um aumento significativo imediatamente após a HD (Pós HD) e que esse aumento nos níveis de nitritos se manteve assim 24 horas após a HD (Pós HD 24h). Porém, quando se avaliaram os níveis de nitritos 48 horas após a HD (Pós HD 48h), observou-se uma redução nos mesmos atingindo novamente os níveis observados no início da avaliação, ou seja, antes da sessão de HD (Pré HD).

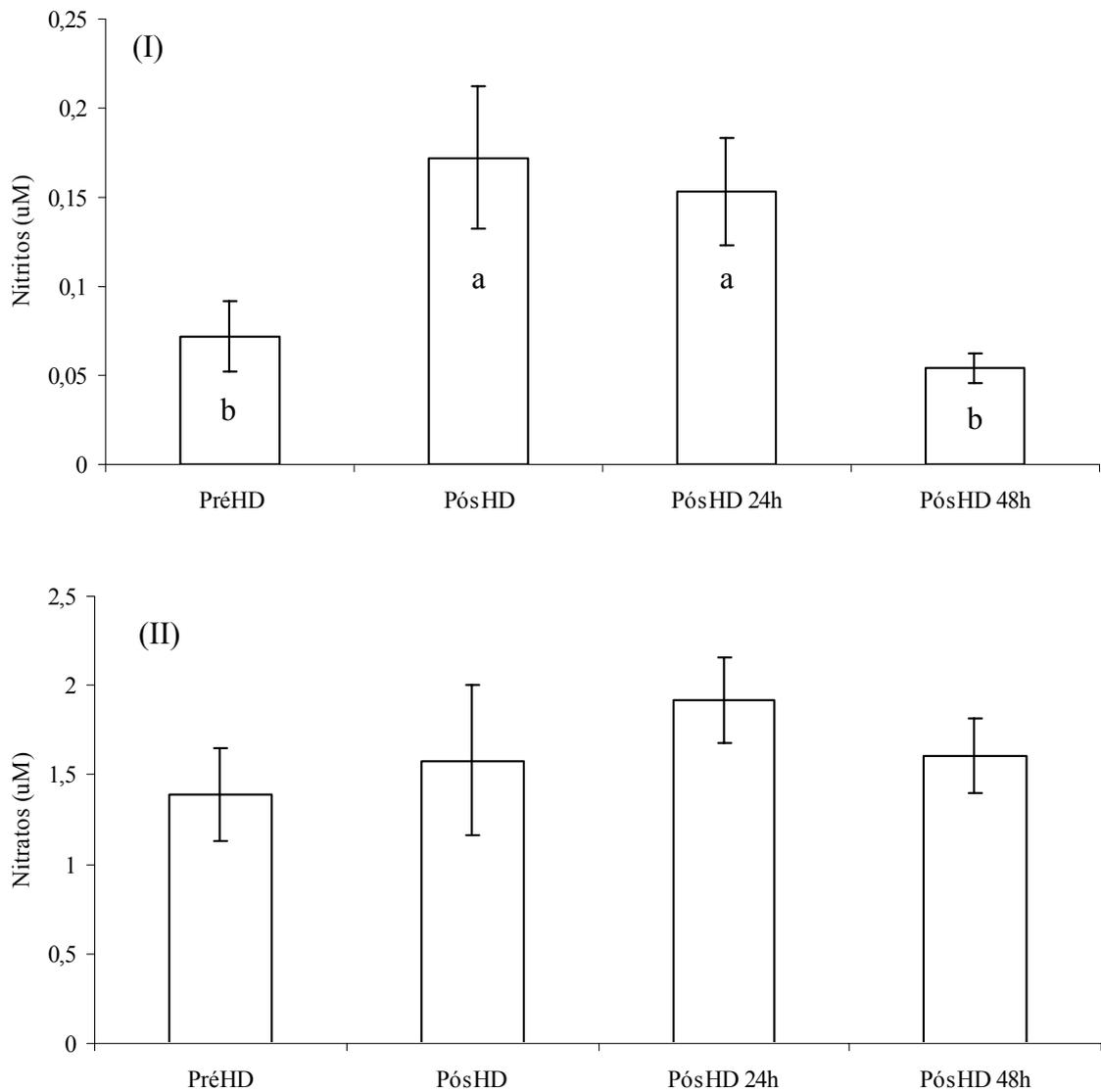


FIGURA 6 – Níveis de nitritos (I) e de nitratos (II), em pacientes submetidos à hemodiálise (HD) antes (PréHD), logo após (PósHD), 24 horas após (PósHD 24h) e 48 horas após (PósHD 48h) o procedimento de diálise. (I) Colunas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. (II) Diferenças não significativas pelo teste F da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

4.2 Avaliação 2 - Sessão Ferro

O segundo momento desse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração de 100 mg de hidróxido de ferro III no estresse oxidativo de doentes renais crônicos em HD. Essa avaliação 2 foi denominada Avaliação Ferro, e seus resultados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 e nas figuras 7 a 9. As determinações foram realizadas em dois momentos distintos: antes da sessão de HD, quando os pacientes estavam sendo conectados às máquinas dialisadoras (Pré HD Ferro) e vinte e quatro horas após a sessão de HD (Pós HD Ferro – 24h). Durante essa avaliação, os pacientes receberam 100 mg de ferro diluídos em soro fisiológico, administrado via endovenosa nos trinta minutos finais da HD.

A Tabela 1 apresenta os dados referentes aos níveis de ferritina, transferrina e proteína reativa C. Pode-se observar que, apesar do aumento nos níveis de ferritina (ng/mL) e aumento nos níveis de transferrina (mg/dL) após a HD, os mesmos não foram estatisticamente significativos após a administração do ferro. Também não houve variação significativa nos níveis de Proteína Reativa C (mg/L) após a administração de ferro.

TABELA 1 – Níveis de ferritina, níveis de transferrina e, níveis de proteína reativa C, antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (Pós HD Ferro – 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa.

Avaliações	Ferritina (ng/mL)	Transferrina (mg/dL)	PRC (mg/L)
Pré HD Ferro	555.4 ± 283 ^{ns 1}	164 ± 5,89 ^{ns}	6,0 ± 3,77 ^{ns}
Pós HD Ferro – 24h	735.9 ± 359	167 ± 8,07	6,4 ± 5,56
<i>Teste t</i>	0,06	0,66	0,26

O sobrescrito^{ns} indica similaridade das variáveis nos tempos avaliados pelo Teste “t” Pareado ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média (n=21 pacientes).

Os dados referentes ao dano oxidativo aos lipídios, avaliado através da quimiluminescência, bem como o dano oxidativo às proteínas, avaliado pela técnica das carbonilas, em uma sessão de HD onde os pacientes receberam 100 mg de ferro por via endovenosa, estão apresentados na Figura 7.

Estudando os dados apresentados, observa-se que os níveis de dano oxidativo, tanto a lipídios, por Quimiluminescência (cps/mg de hemoglobina), como a proteínas, através das carbonilas (nmol/mg de proteína), não foram modificados de forma significativa com a administração de ferro aos pacientes renais crônicos avaliados.

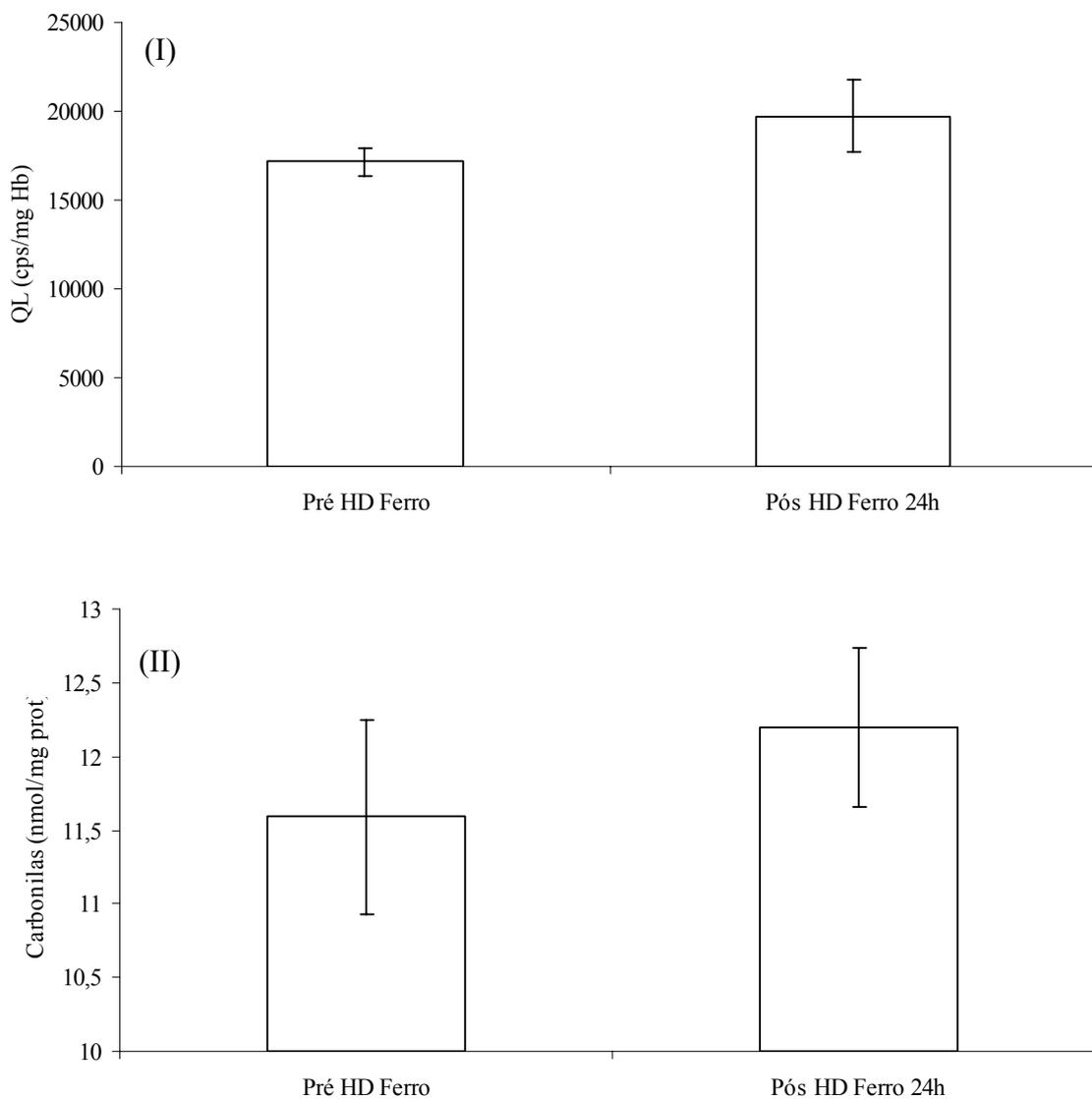


FIGURA 7 – Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas medida em carbonilas (II), antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa. Em (I) ($p=0,86$) e (II) ($p=0,50$), diferenças não significativas pelo Teste t Pareado ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média ($n=21$).

O sistema antioxidante de defesa enzimático foi avaliado através da mensuração da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). Nenhuma das enzimas antioxidantes avaliadas apresentou variação significativa após sessão de HD onde os pacientes receberam ferro. Os resultados encontrados para as respectivas enzimas antioxidantes estão mostrados nas Figuras 8 e 9.

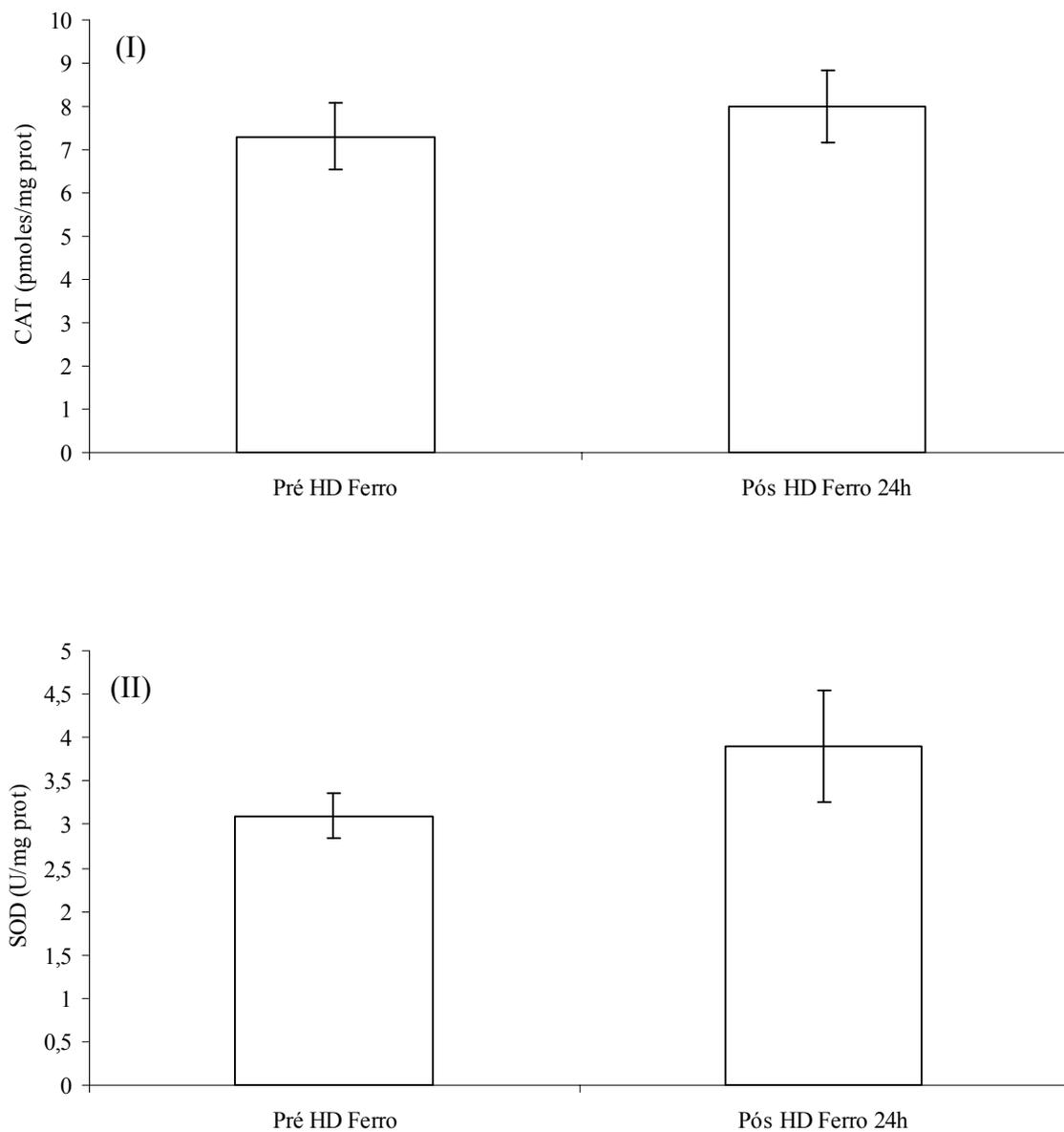


FIGURA 8 – Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa. Em (I) ($p=0,43$) e (II) ($p=0,15$), diferenças não significativas pelo Teste t Pareado ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média ($n=21$).

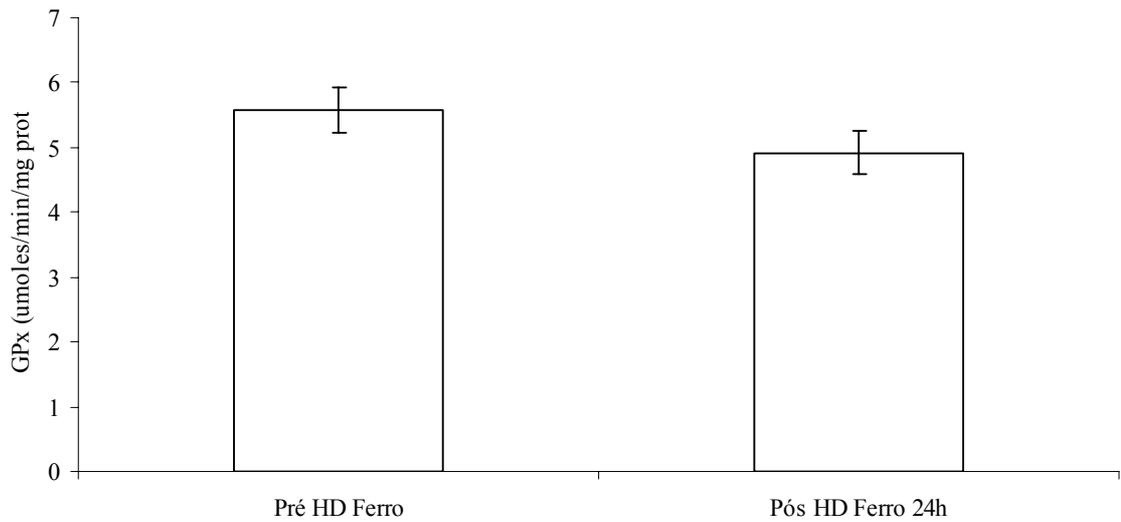


FIGURA 9 – Atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (HD) (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa. Diferenças não significativas ($p=0,15$), pelo Teste t Pareado ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média ($n=21$).

Na Figura 10 estão apresentados os valores dos níveis de nitritos e nitratos no plasma dos pacientes renais crônicos em HD, na sessão onde os mesmos receberam uma dose de 100 mg de ferro por via endovenosa no período final da sessão de HD.

Assim como ocorreu na Sessão Controle, observou-se um aumento nos níveis de nitritos 24 horas após sessão de HD. Os dados obtidos para nitratos após HD com ferro não foram diferentes dos obtidos antes da sessão.

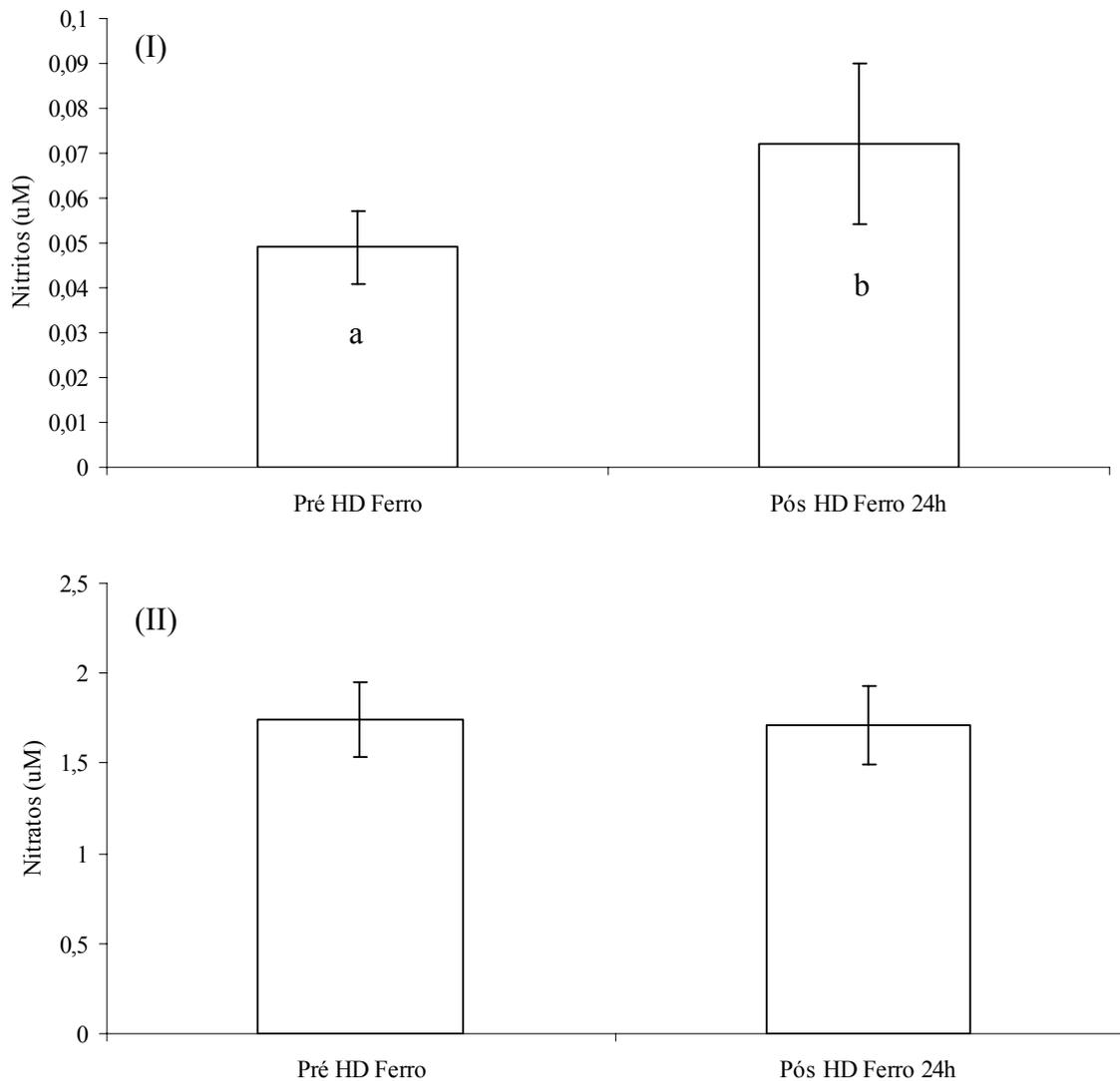


FIGURA 10 – Níveis de nitritos (I) e de nitratos (II) antes (Pré HD Ferro) e 24 horas após uma sessão de hemodiálise (pós HD 24h) onde os pacientes receberam 100 mg de hidróxido de ferro por via endovenosa. (I) Colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo Teste t Pareado ao nível de 5% de probabilidade de erro ($p=0,05$). (II) Diferenças não significativas ($p=0,62$) pelo Teste t Pareado ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média ($n=21$).

Observando-se as tabelas e figuras que trazem as variáveis avaliadas antes e 24 horas após a administração de ferro em uma HD, pode-se afirmar que uma única administração de ferro não interferiu no dano oxidativo a lipídios e proteínas, bem como a atividade das enzimas antioxidantes não foi modificada até 24 horas após a sessão de HD.

O metabolismo do óxido nítrico apresentou comportamento parecido com o observado na sessão controle, onde os níveis de nitratos não foram alterados e os níveis de nitritos estavam aumentados 24 horas após a HD.

4.3 Avaliação Ferro

Os efeitos sobre o estresse oxidativo e variáveis bioquímicas da sessão de HD sem a administração de ferro, bem como os efeitos da administração de ferro isolada e concomitante à suplementação de vitamina E em diferentes doses, estão apresentados nas Tabelas 2 a 5 e nas Figuras 11 a 14.

Como o objetivo neste momento do estudo é avaliar os efeitos do ferro, optou-se por analisar as avaliações realizadas sempre 24 horas após a sessão de HD em questão. Em virtude disso denominou-se esta avaliação de Avaliação Ferro. Foi analisado o efeito do ferro em quatro momentos distintos e, ainda, o efeito isolado da HD. Para melhor entendimento das tabelas, Pós HD Controle representa os dados encontrados 24 horas após HD sem administração de ferro e ou vitamina E; Pós HD Ferro, 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro; Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única, 24 horas após HD com administração prévia de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro durante sessão de HD; Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias, 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E e 100 mg de ferro durante sessão de HD; e Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias, 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro durante sessão de HD.

Na Tabela 2, estão representados os valores de hematócrito e hemoglobina nos tempos avaliados. Pode-se observar que não houve variação nos níveis de hemoglobina e também no hematócrito dos pacientes ao longo do estudo. O hematócrito idealizado para os pacientes renais é acima de 36%; pode-se observar que os níveis observados nos pacientes avaliados neste estudo não atingem os níveis ideais esperados.

TABELA 2 – Hematócrito e hemoglobina 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias).

Avaliações	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)
Pós HD Controle	34,1 ± 1,12 ^{ns}	11,0 ± 0,38 ^{ns}
Pós HD Ferro	34,6 ± 1,12	11,0 ± 0,38
Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única	35,2 ± 1,15	11,2 ± 0,36
Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias	32,2 ± 0,91	10,4 ± 0,28
Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias	32,9 ± 1,21	10,7 ± 0,41
<i>Prob. de F tratamento</i>	0,15	0,16
<i>Coefficiente de variação (%)</i>	6,4	6,3

^(ns) Valores de F da análise de variância, não significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média (n=21 pacientes).

O perfil lipídico dos pacientes estudados está apresentado na Tabela 3. O perfil lipídico dos pacientes foi avaliado através das medidas bioquímicas de colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL.

As medidas de colesterol total, HDL e LDL, foram realizadas sempre no início da sessão de HD onde os pacientes eram avaliados para verificar o efeito do tratamento realizado com vitamina E.

Pode ser observado na tabela abaixo que não houve variação significativa no perfil lipídico dos pacientes ao longo do estudo em todas as variáveis estudadas.

TABELA 3 – Níveis de colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL, 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias).

Avaliações	Colesterol Total (mg/dL)	Colesterol HDL (mg/dL)	Colesterol LDL (mg/dL)
Pós HD Controle	178 ± 12,62 ^{ns}	36 ± 2,41 ^{ns}	107 ± 17,60 ^{ns}
Pós HD Ferro	178 ± 12,62	36 ± 2,41	107 ± 17,60
Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única	181 ± 12,60	36 ± 2,28	112 ± 26,53
Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias	184 ± 12,96	34 ± 2,42	115 ± 11,40
Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias	189 ± 17,90	34 ± 3,00	115 ± 16,63
<i>Prob. de F tratamento</i>	0,34	0,57	0,44
<i>Coeficiente de variação (%)</i>	7,0	11,2	11,4

^(ns) Valores de F da análise de variância, não significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média (n=21 pacientes).

Os níveis de ferritina, transferrina e proteína reativa C estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 4). Os níveis de ferritina, após as sessões onde foi realizada a suplementação de ferro, foi superior à sessão controle onde os pacientes não receberam suplementação. Não houve diferença estatística para os níveis de ferritina quando se compararam as sessões com suplementação de vitamina E com a sessão ferro, onde os pacientes receberam apenas ferro ao final da sessão. Observa-se que, apesar de todas as sessões seguintes à sessão ferro receberem suplementação, em nenhuma delas, os níveis aumentaram significativamente.

Os níveis de transferrina apresentaram variação significativa ao longo do estudo quando se comparou o tempo 24 horas após cada sessão de HD avaliada, observa-se que houve uma queda nos níveis de transferrina quando comparados com os níveis obtidos após a sessão de HD onde o paciente não recebeu suplementação com ferro e ou vitamina E e após, as sessões onde recebeu algum tipo de suplementação. Porém os níveis mais baixos de transferrina foram observados 24 horas após a sessão de HD onde o paciente recebeu uma dose aguda de 800 mg seis a oito horas antes da HD. Os níveis de transferrina observados após as sessões com ferro e suplementação crônica de vitamina E, independente da dose utilizada, também foram estatisticamente diferentes dos observados na sessão sem ferro e sem vitamina E, mas não foram diferentes dos observados na sessão onde o paciente recebeu apenas ferro.

Os valores obtidos para proteína reativa C nos tempos 24 horas das sessões de HD avaliadas apresentaram variação significativa. Observa-se que os níveis mais altos são os obtidos na primeira sessão avaliada, ou seja, na sessão onde não houve administração de ferro nem de vitamina E. Em todas as outras avaliações, os níveis de proteína reativa C foram significativamente mais baixos. Não houve variação significativa entre os dados das sessões com administração de ferro e vitamina E e dessas com a sessão onde se administrou apenas ferro.

TABELA 4 – Níveis de ferritina, níveis de transferrina e níveis de proteína reativa C 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias).

Avaliações	Ferritina (ng/mL)	Transferrina (mg/dL)	PRC (mg/L)
Pós HD Controle	639 ± 306 ^{ns}	169 ± 7,7 a ¹	13,1 ± 3,53 a ¹
Pós HD Ferro	736 ± 359	167 ± 8,0 a	6,4 ± 5,56 b
Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única	796 ± 320	153 ± 6,3 b	6,2 ± 3,36 b
Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias	790 ± 129	158 ± 5,0 ab	6,5 ± 1,32 b
Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias	712 ± 214	185 ± 5,4 a	8,6 ± 2,85 b
<i>Prob. de F tratamento</i>	0,55	0,01	0,0046
<i>Coefficiente de variação (%)</i>	18,19	5,0	56,4

^(ns) Valores de F da análise de variância, não significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹ Médias seguidas pela mesma letra, comparadas nas colunas, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média (n=21 pacientes).

A Tabela 5 apresenta os dados obtidos para os níveis de uréia e ácido úrico 24 horas após cada sessão de HD avaliada. Observa-se variação significativa para os níveis de uréia ao longo do estudo. Os valores obtidos para os níveis de uréia 24 horas após a administração de ferro foram significativamente inferiores aos observados após a sessão controle. Os níveis de uréia nas sessões onde houve administração de vitamina E foram significativamente inferiores aos observados na sessão controle, porém apenas os valores encontrados 24 horas após a HD com suplementação crônica de 400 mg de vitamina E, foram significativamente mais baixos que os observados após a sessão onde o paciente recebeu apenas ferro.

Os dados obtidos para o ácido úrico nos tempos avaliados não apresentaram variação significativa.

TABELA 5 – Concentração de uréia e ácido úrico 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem administração de ferro e ou vitamina E (Pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (Pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg (aguda) e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias).

Avaliações	Uréia (mg/dL)	Ácido úrico (mg/dL)
Pós HD Controle	156,9 ± 9,93 a	4,73 ± 0,28 ^{ns}
Pós HD Ferro	125,8 ± 8,42 b	4,59 ± 0,17
Pós HD Ferro+800mg vit E/dose única	115,8 ± 10,40 bc	4,26 ± 0,17
Pós HD Ferro+400mg vit E/dia/30dias	110,5 ± 8,07 c	4,30 ± 0,20
Pós HD Ferro+800mg vit E/dia/30dias	113,0 ± 11,32 bc	4,40 ± 0,23
<i>Prob. de F tratamento</i>	<0,0001	0,17
<i>Coefficiente de variação (%)</i>	12,2	10,8

^(ns) Valores de F da análise de variância, não significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra, comparadas nas colunas, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média ± erro padrão da média (n=21 pacientes).

A Figura 11 apresenta os dados referentes ao dano oxidativo a lipídios, lipoperoxidação, avaliado através da quimiluminescência (QL), bem como o dano oxidativo às proteínas, avaliado através da técnica das carbonilas.

A figura seguinte mostra que houve variação significativa tanto na QL quanto nos níveis de carbonilas ao longo do estudo.

Os maiores níveis de lipoperoxidação foram observados 24 horas após a HD onde os pacientes receberam suplementação de 100 mg de ferro. Os dados obtidos nessa avaliação foram estatisticamente superiores aos observados em todos os outros tempos avaliados.

Os valores de QL encontrados 24 horas após as sessões de HD onde, além da suplementação de 100 mg de ferro, os pacientes receberam alguma forma de administração

de vitamina E, foram significativamente inferiores aos observados na sessão HD onde os pacientes receberam apenas ferro.

Todas as doses de vitamina E utilizadas neste estudo foram eficazes na proteção ao dano oxidativo aos lipídios. Porém, os menores valores para a lipoperoxidação foram observados na dose 800 mg, tanto na sua administração de forma aguda, ou seja, seis a oito horas antes da HD, quanto na administração crônica, 800 mg/dia durante trinta dias.

O dano às proteínas também apresentou variação significativa ao longo do estudo. Não houve variação nos níveis de carbonilas quando se comparou o tempo 24 horas após a HD em que os pacientes receberam ferro, com 24 horas após a sessão controle. Portanto, a sessão ferro não interferiu nos níveis das carbonilas. A suplementação aguda de 800 mg de vitamina E também não alterou os níveis de carbonilas observados. Porém, quando os pacientes passaram a ingerir diariamente vitamina E, tanto 400 mg, quanto 800 mg dia, observou-se uma redução significativa nos níveis de carbonilas.

Assim, o tratamento crônico com vitamina E nas doses utilizadas foi eficaz na redução dos níveis de oxidação das proteínas.

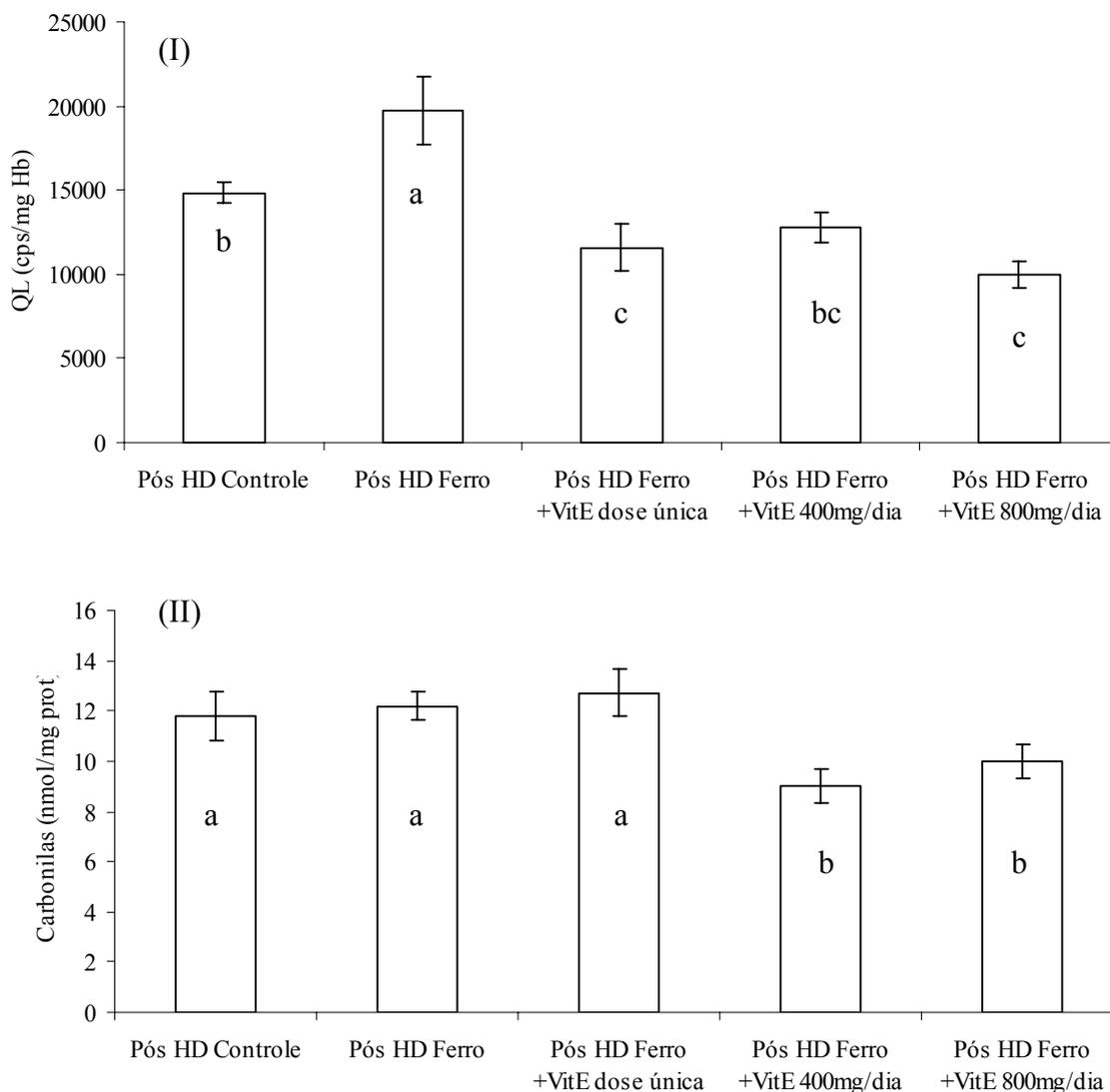


FIGURA 11 – Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas-Carbonilas (II), 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia). Em (I) e (II), colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

A atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, avaliadas 24 horas após as sessões de HD estudadas, estão apresentadas nas Figuras 12 e 13.

A atividade da enzima antioxidante catalase apresentou variação significativa durante o estudo. Os níveis de catalase foram significativamente superiores 24 horas após as sessões de HD onde houve administração de ferro. O aumento da atividade da catalase ocorreu independentemente da administração de vitamina E. A sessão controle, onde os pacientes não receberam ferro nem vitamina E, apresentou os menores valores de atividade da catalase.

A enzima glutathione peroxidase não apresentou variação significativa na sua atividade quando se avaliou o tempo 24 horas após as sessões de HD.

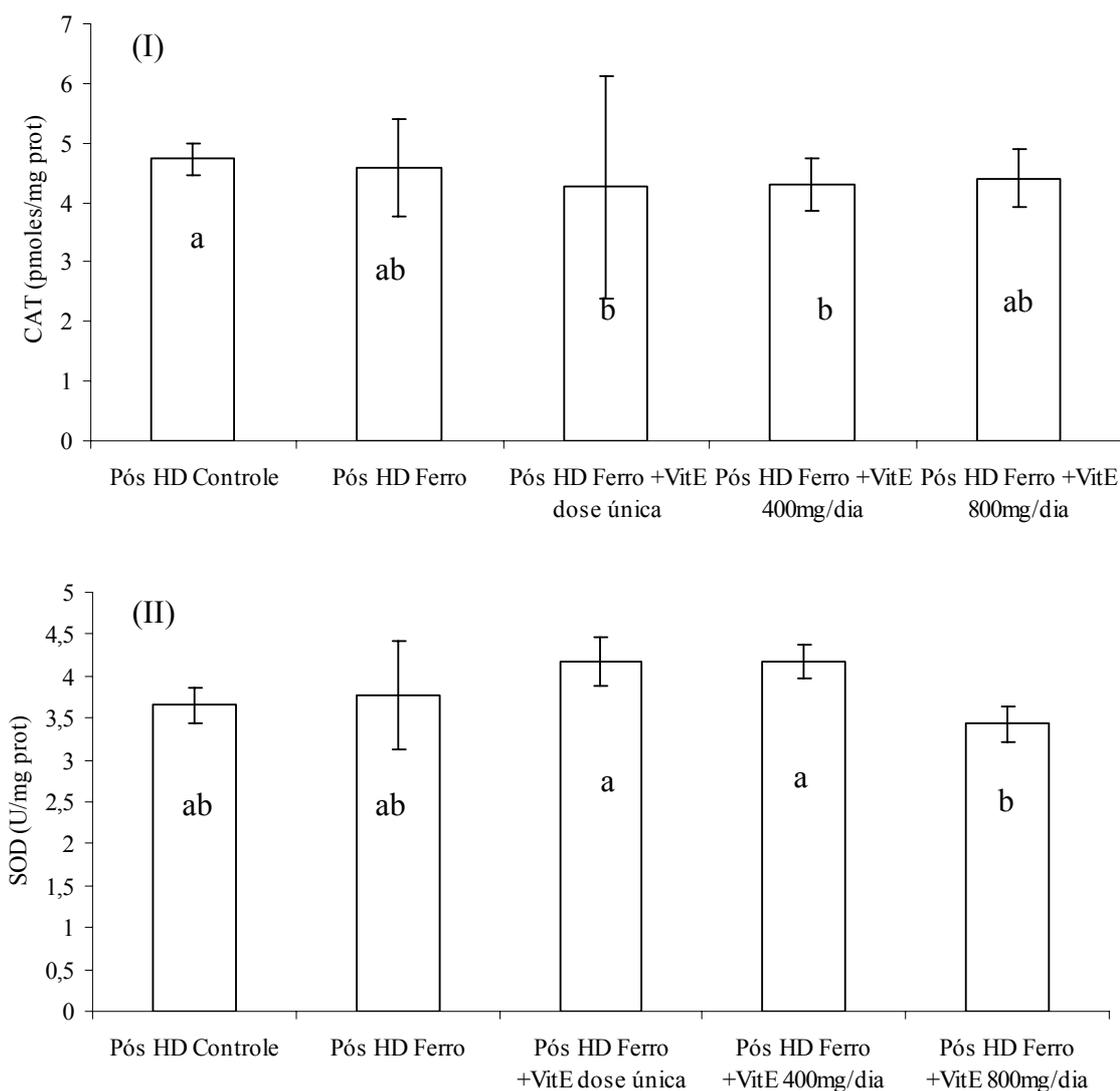


FIGURA 12 – Atividade das enzimas antioxidantes catalase-CAT (I) e superóxido dismutase-SOD (II), 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia). Em (I) e (II), colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

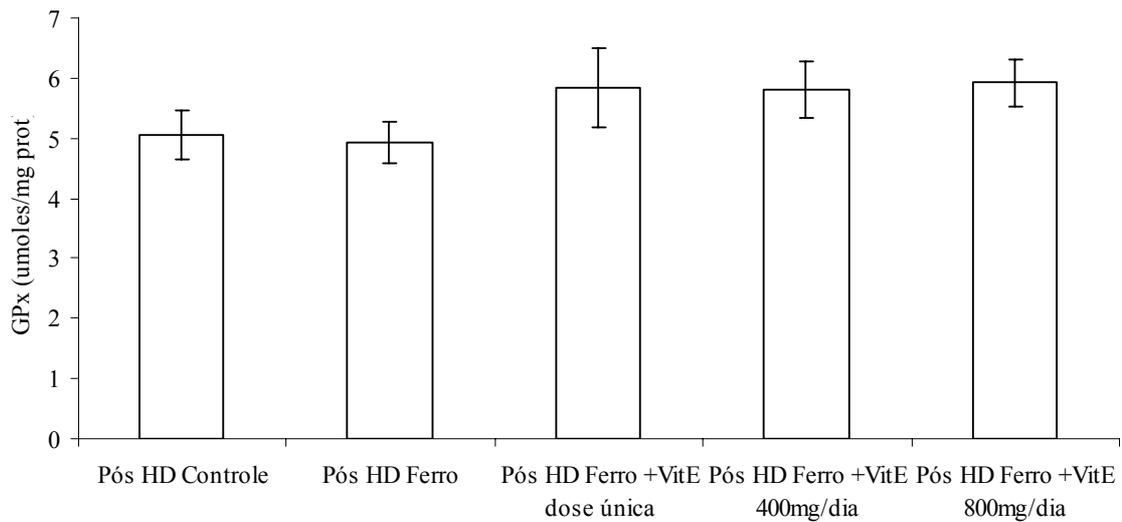


FIGURA 13 – Atividade da enzima antioxidante glutationa peroxidase (GPx) 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia). Diferenças não significativas pelo teste F da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

A Figura 14 apresenta os níveis de nitritos e nitratos observados 24 horas após todas as sessões de HD avaliadas.

Os níveis de nitritos apresentaram variação significativa. Observou-se que os níveis de nitritos foram significativamente inferiores nas sessões onde os pacientes receberam suplementação com 100 mg de ferro, independentemente de estarem ou não recebendo vitamina E, quando comparados com os valores obtidos 24 horas após a sessão controle onde os mesmos não receberam nem ferro, nem vitamina E.

Observa-se que não houve variação significativa nos níveis de nitratos observados 24 horas após as sessões de HD durante todo o estudo.

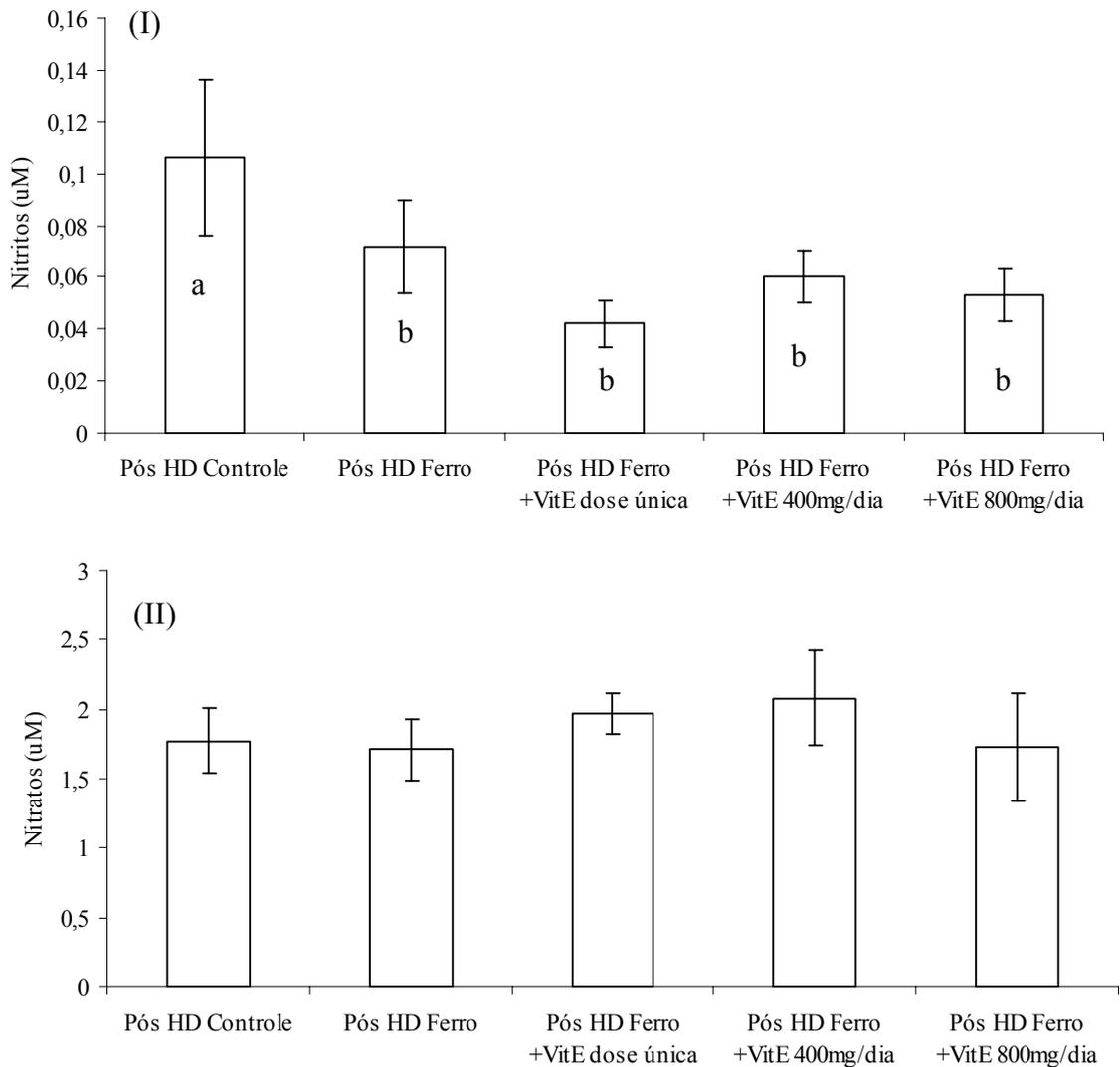


FIGURA 14 – Níveis de nitritos (I) e nitratos (II), 24 horas após sessão de hemodiálise (HD) sem ferro e ou vitamina E (pós HD Controle); 24 horas após HD com administração de 100 mg de ferro (pós HD Ferro); 24 horas após HD com administração de vitamina E 800 mg e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE dose única); 24 horas após HD com administração crônica de 400 mg vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 400mg/dia); e 24 horas após HD com administração crônica de 800 mg de vitamina E e 100 mg de ferro (Pós HD Ferro + VitE 800mg/dia). (I) Colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. (II) Diferenças não significativas pelo teste F da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade do erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

4.4 Vitamina E

As Figuras 15 a 18 apresentam os dados referentes aos efeitos da Vitamina E no estresse oxidativo dos pacientes estudados. Este momento do estudo visa demonstrar os efeitos isolados da vitamina E. Para isso, analisaram-se os dados obtidos sempre no início da sessão de HD, antes de os pacientes receberem ferro, administrado nos trinta minutos finais da HD.

Nas figuras, Pré HD Controle representa os dados obtidos da coleta de sangue realizada antes de uma HD sem administração prévia de Vitamina E; Pré HD 800 mg vit E/dose única representa os dados da coleta realizada antes de uma HD após administração aguda de 800 mg de vitamina E; Pré HD 400 mg vit E/dia/30dias, os dados da coleta realizada antes de uma HD após administração crônica de 400 mg de vitamina E (trinta dias); e Pré HD 800 mg vit E/dia/30dias, os dados obtidos da coleta realizada antes de uma HD após administração crônica de 800 mg de vitamina E (trinta dias).

O dano aos lipídios de membrana, lipoperoxidação (LPO), de eritrócitos foi avaliado por quimiluminescência. Os dados da repercussão da suplementação com vitamina E na lipoperoxidação dos doentes renais crônicos estão apresentados na Figura 15. Pode-se observar que os valores observados Pré HD Controle foram significativamente superiores aos encontrados nos tempos seguintes. O Pré HD Controle representa a avaliação antes de uma sessão de HD onde o paciente não recebeu suplementação prévia de vitamina E. Esses dados mostram que as doses utilizadas, independentemente da forma, aguda ou crônica, determinaram redução nos níveis de dano oxidativo nos lipídios dos pacientes estudados.

Não se constatou diferença significativa quando foi comparado Pré HD 800 mg vit E/dose única e Pré HD 400 mg vit E/dia/30dias, ou seja, não houve diferença significativa entre os efeitos de uma dose aguda de vitamina E (800 mg) seis a nove horas

antes da HD com os efeitos obtidos em virtude da suplementação diária de vitamina E (400 mg) por um período de trinta dias.

Observando ainda os dados referentes à LPO, constata-se que os níveis foram ainda mais baixos após a suplementação diária de vitamina E numa dose mais elevada, neste caso, 800 mg via oral.

O dano oxidativo às proteínas foi avaliado pelo método das carbonilas. Na Figura 15, estão apresentados os dados encontrados para essa variável.

Assim como ocorreu com a LPO, houve redução nos níveis de carbonilas quando os pacientes recebiam suplementação com vitamina E. A redução nos níveis de carbonilas ocorreu tanto com a suplementação aguda, 800 mg de vitamina E via oral seis a nove horas antes da HD, ou crônica, 400 mg e ou 800 mg de vitamina E via oral por um período de trinta dias.

Quando se compararam os resultados entre as diferentes formas de suplementação de vitamina E, constatou-se que o tratamento crônico com 800 mg/dia foi mais eficiente na redução dos níveis de dano oxidativo a proteínas.

Portanto, pode-se afirmar que, a suplementação com vitamina E foi efetiva na redução do dano oxidativo a lipídios e a proteínas dos doentes renais crônicos estudados e que, quando administrada continuamente em maiores doses, neste caso, 800 mg/dia, essa redução foi ainda mais efetiva.

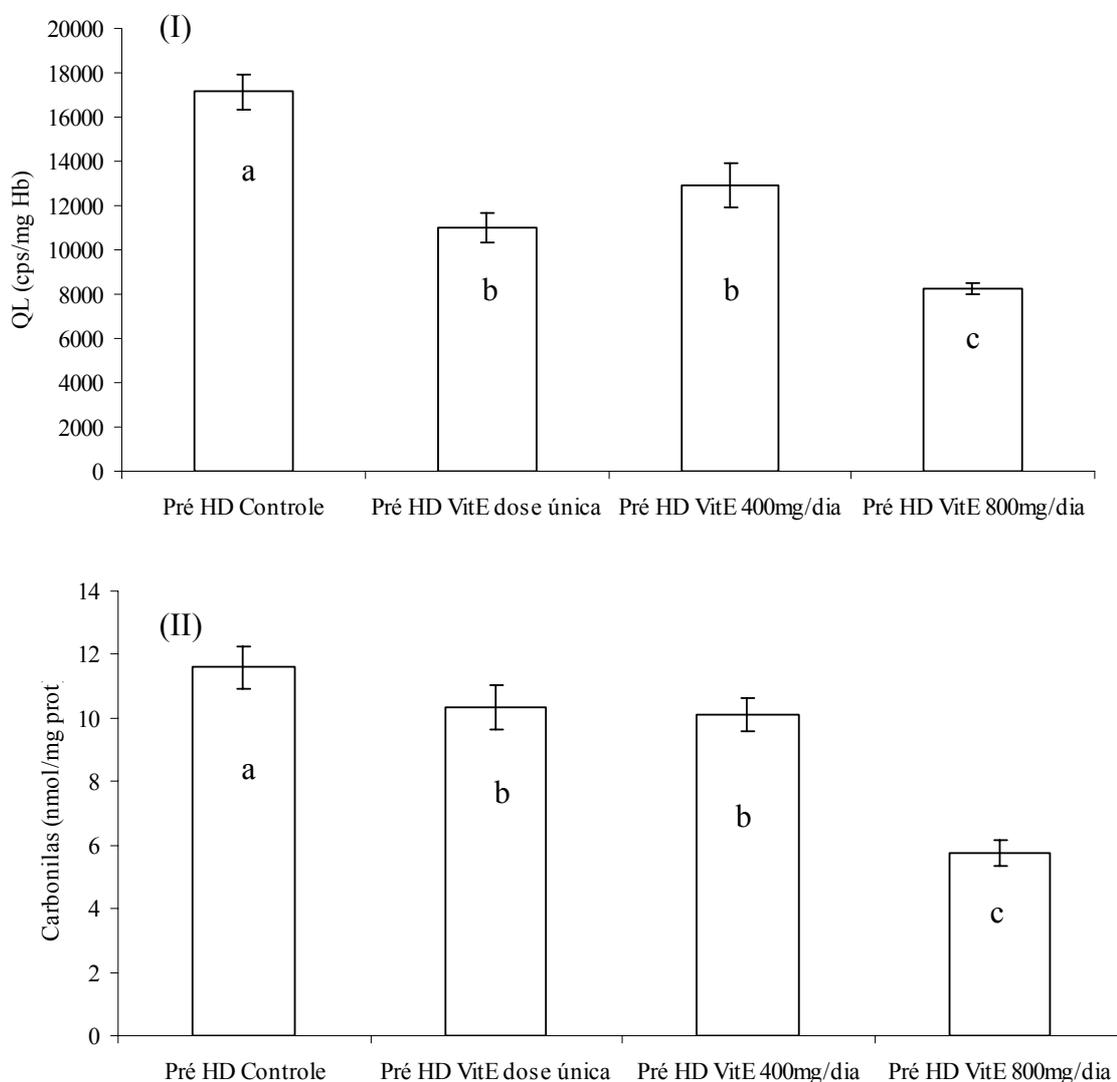


FIGURA 15 – Lipoperoxidação medida por quimiluminescência-QL (I) e oxidação de proteínas medida em carbonilas (II), antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia). Em (I) e (II), colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

A atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase avaliadas antes das sessões de HD estão apresentadas nas figuras 16 e 17 respectivamente.

Como pode-se observar na Figura 16, a atividade da enzima antioxidante catalase não sofreu variação significativa quando avaliada antes das sessões de HD, independentemente da administração de vitamina E.

Entretanto, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase sofreram variação significativa ao longo do estudo quando avaliadas antes das sessões de HD.

A enzima superóxido dismutase apresentou aumento de sua atividade antes das sessões de HD em que havia sido realizada administração aguda de 800 mg de vitamina E e, também, antes da sessão de HD onde os pacientes haviam recebido 400 mg de vitamina E por um período de trinta dias. Já na avaliação pré HD onde os pacientes haviam recebido 800 mg dia de vitamina E por um período de trinta dias, a atividade da superóxido dismutase foi semelhante à observada antes da HD sem a administração de vitamina E.

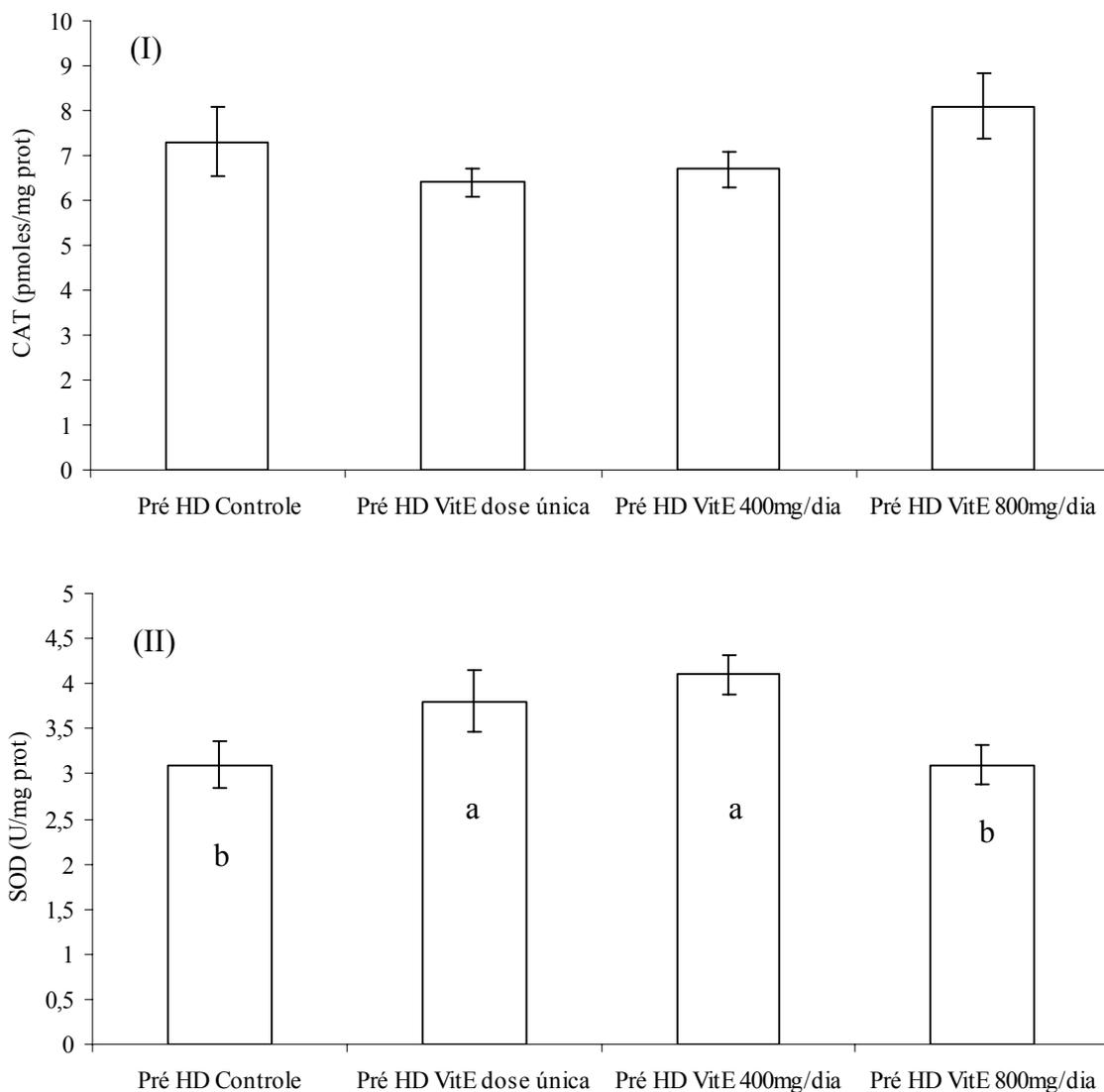


FIGURA 16 – Atividade das enzimas antioxidantes catalase-CAT (I) e superóxido dismutase-SOD (II), antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia). (I) Diferenças não significativas pelo teste F da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade do erro. (II) Colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

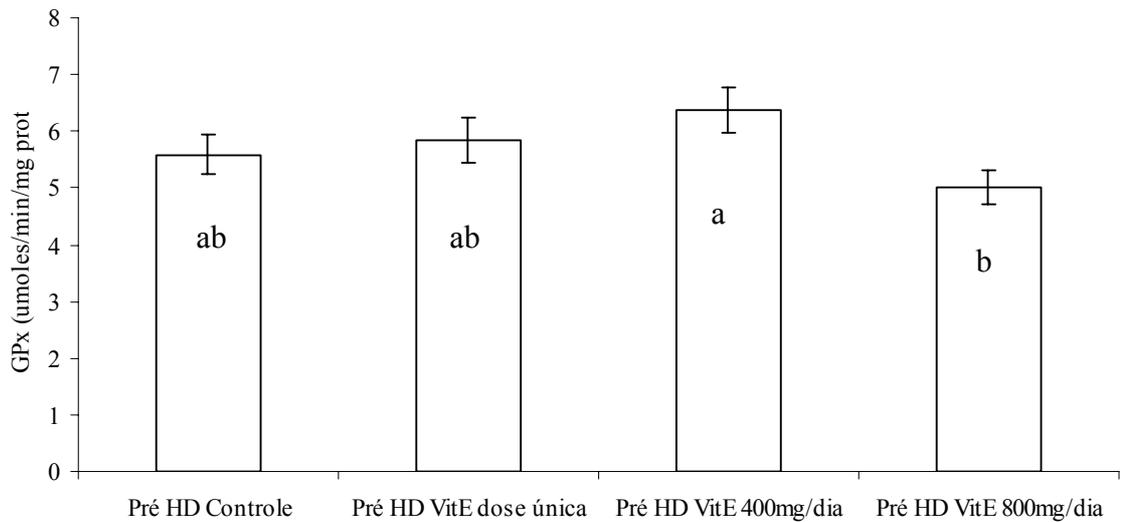


FIGURA 17 – Atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia). Colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

Os níveis de nitritos e nitratos avaliados antes das sessões de HD estudadas estão representados na Figura 18.

Pode-se observar que, antes das sessões de HD avaliadas, não houve variação significativa nos níveis de nitritos .

Os níveis de nitratos apresentaram variação significativa quando determinados antes das sessões de HD avaliadas. Observa-se que, na presença de vitamina E administrada cronicamente, os valores foram significativamente superiores aos observados antes da sessão de HD na qual não foi administrada a vitamina. Os níveis de nitratos foram semelhantes entre si quando foram administrados 800 mg de vitamina E, aguda e cronicamente. Porém, os níveis mais altos de nitratos foram observados antes da HD, após a administração crônica de 400 mg de vitamina.

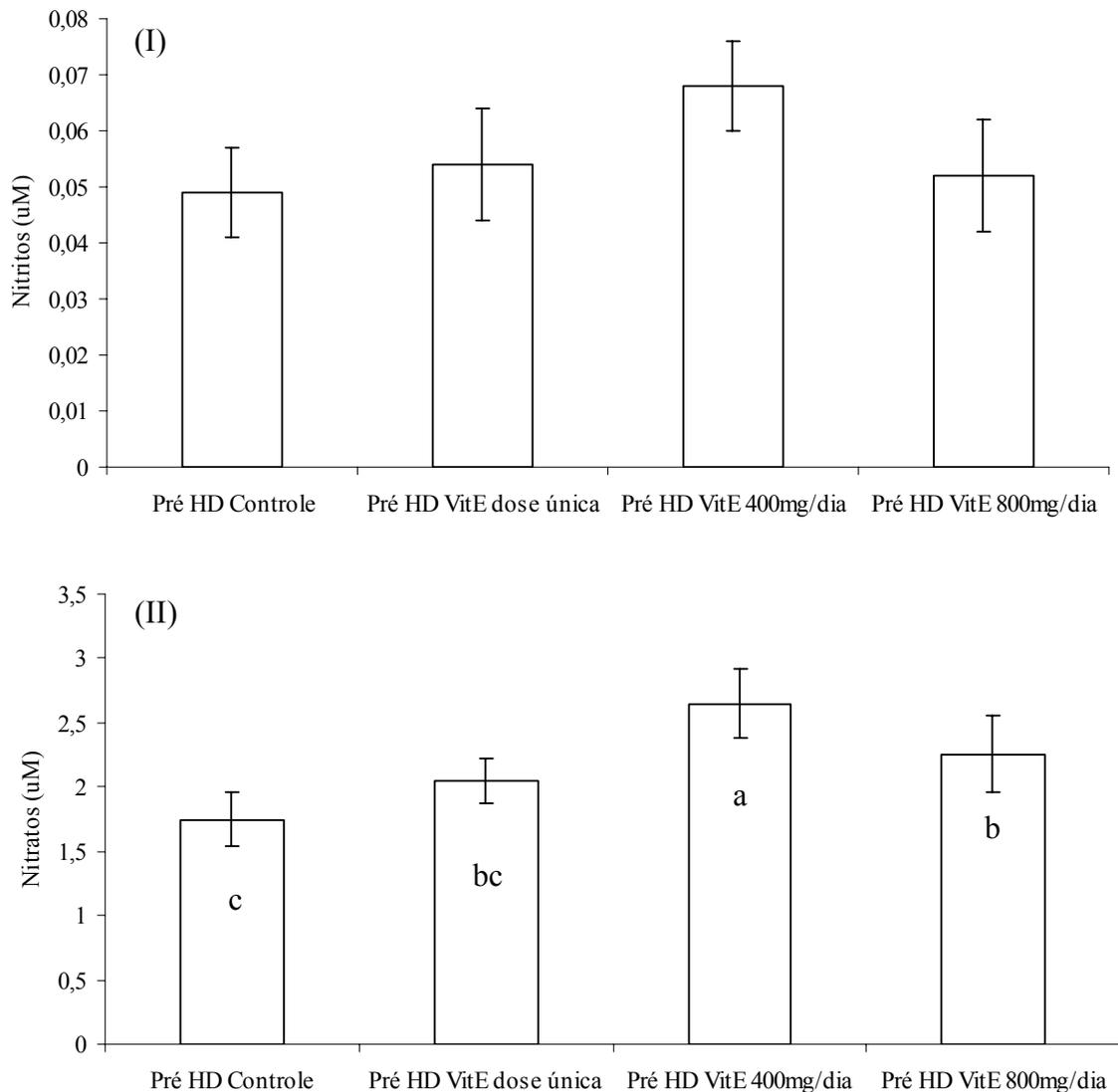


FIGURA 18 – Níveis de nitritos (I) e nitratos (II), antes de uma sessão de hemodiálise (HD) sem vitamina E (Pré HD Controle); antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E (Pré HD VitE dose única); antes de uma HD com administração prévia de 400 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 400mg/dia); e antes de uma HD com administração prévia de 800 mg de vitamina E por trinta dias (pré HD VitE 800mg/dia). (I) Diferenças não significativas pelo teste F da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade do erro. (II) Colunas representadas com a mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores estão representados em média \pm erro padrão da média (n=21).

5. DISCUSSÃO

Vários estudos mostram que marcadores de estresse oxidativo estão aumentados na insuficiência renal crônica. O estresse oxidativo nos doentes renais que realizam hemodiálise ocorre pela produção exagerada de espécies ativas de oxigênio por ativação de leucócitos e possivelmente, por outras células; pela presença de toxinas urêmicas com propriedades pró-oxidantes; pela ação de metais de transição e enzimas que catalisam as reações das espécies ativas de oxigênio; por defesas antioxidantes reduzidas (GIRAY et al., 2003).

A avaliação da extensão do estresse oxidativo no sangue dos pacientes foi realizada utilizando métodos padronizados. As técnicas utilizadas neste trabalho são usadas rotineiramente para definir o papel do estresse oxidativo em diferentes patologias, podendo ser usadas também para realização de diagnóstico clínico. Determinações cinesiológicas, eletrofisiológicas e bioquímicas, realizadas nas fezes, saliva, urina e suor, são usualmente consideradas marcadores periféricos. Procedimentos bioquímicos realizados no plasma e eritrócitos são considerados marcadores periféricos minimamente invasivos (REPETTO et al., 1999; GUTIERREZ et al., 2006).

Para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e níveis de LPO, através da QL, utilizaram-se glóbulos vermelhos e, para avaliação dos níveis de nitritos, nitratos e carbonilas, utilizou-se plasma. Os glóbulos vermelhos são utilizados como modelo de estresse oxidativo em muitos trabalhos porque eles estão expostos a altas pressões de oxigênio, além disso, contêm hemoglobina, com presença de

ferro, e uma membrana plasmática rica em ácidos graxos poliinsaturados suscetíveis a oxidações causadas por reações de que participam radicais e espécies ativas de oxigênio. Os eritrócitos possuem muitos sistemas de defesa antioxidante que os protegem do dano oxidativo causado por estas espécies, por isso podem ser considerados células representativas onde o radical superóxido está sendo gerado de forma contínua a partir da auto-oxidação da hemoglobina, e podem ser utilizados para a avaliação do balanço entre espécies pró e antioxidantes (REPETTO et al., 1996; REPETTO et al., 1999).

Marcadores periféricos de estresse oxidativo em eritrócitos e plasma avaliados através de técnicas que utilizam a quimiluminescência como ferramenta são preferíveis, pois são métodos sensíveis e rápidos que permitem avaliar e quantificar espécies tóxicas de oxigênio na amostra. São técnicas não-invasivas, pois requerem apenas pequenas quantidades de fluidos biológicos dos pacientes (REPETTO et al., 1999).

Um dos marcadores de estresse oxidativo avaliado neste estudo foi o dano oxidativo aos lipídios, lipoperoxidação (LPO). A LPO tem sido demonstrada estar envolvida na patogênese de doenças como aterosclerose e câncer, doenças comumente encontradas entre os doentes renais crônicos que realizam hemodiálise.

Níveis aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) têm sido relatados nesses pacientes, porém não está claro se o aumento da LPO é causado pela diálise ou pela patologia propriamente dita. Não pode ser excluída a possibilidade de que a LPO aumente em função do tratamento hemodialítico, já que é possível que granulócitos sejam ativados pelas membranas de diálise, resultando na geração de espécies ativas de oxigênio (EAO), capazes de oxidar lipídios do plasma e dos eritrócitos. Além disso, o sangue é exposto a um grande fluxo e a superfícies artificiais durante o circuito extracorpóreo. O TBARS pode também ser formado durante a peroxidação do ácido araquidônico pelas enzimas lipoxigenase e cicloxigenase (SCHETTLER et al., 1994).

Um aumento nos níveis de TBARS nos eritrócitos de pacientes em hemodiálise foi observado por Paul et al. (1993), não havendo correlação com sexo, idade, tipo de membrana de diálise ou duração do tratamento. Neste trabalho, os autores não constataram variação do TBARS no plasma desses pacientes.

Utilizando HPLC – cromatografia líquida de alta performance, Peuchant et al. (1994) observaram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), um produto final da LPO, no plasma de pacientes renais, aumentando ainda mais após diálise. Nos eritrócitos desses pacientes, os níveis de MDA, antes e após sessão de hemodiálise, não diferiram dos níveis observados em indivíduos controle.

Hirayama et al. (2000) avaliaram a LPO através do TBARS e hidroperóxido de fosfatidilcolina (PCOOH) no plasma e eritrócitos antes e após sessão de hemodiálise. A mensuração do PCOOH foi realizada com o objetivo de medir um produto mais específico da peroxidação lipídica e pela fosfatidilcolina ser um componente dominante da camada externa da membrana dos eritrócitos. Foram encontrados níveis significativamente maiores de TBARS e PCOOH no plasma e nos eritrócitos dos pacientes que nos controles, sugerindo um aumento no estado oxidativo daqueles pacientes. Os valores não foram modificados pela hemodiálise.

O TBARS também foi avaliado no tecido adiposo subcutâneo de doentes renais crônicos. Este estudo observou que o nível do TBARS do tecido adiposo subcutâneo nos doentes renais era significativamente maior se comparado aos níveis de TBARS encontrados no plasma e eritrócitos destes. Uma das teorias propostas para explicar esses achados é que peróxidos lipídicos produzidos em outros órgãos podem ser transportados pela circulação e acumulados no tecido adiposo. O TBARS foi avaliado nos diferentes níveis da doença renal: fase inicial com tratamento conservador, fase inicial do tratamento com hemodiálise e tratamento regular com hemodiálise. Em todos os grupos de pacientes,

os valores observados eram significativamente mais elevados do que os níveis encontrados em indivíduos controle. Os autores sugerem que o TBARS no tecido subcutâneo pode ser um marcador sensível da LPO (GOTOH et al., 1997).

Uma das teorias preconizadas é que a lipoperoxidação ocorre durante a diálise devido à ativação de células inflamatórias causadas pela bioincompatibilidade das membranas de diálise. Isso levaria à ativação de lipopolissacarídeos ou citocinas inflamatórias (MAHER et al., 1987; WRATTEN et al., 2000). Além disso, o estresse oxidativo pode também ocorrer como consequência do grande fluxo a que o sangue é submetido durante a sessão de diálise (SCHETTLER et al., 1994).

Contrastando com os trabalhos já mencionados, Erdogan et al. (2002) não observaram aumento nos níveis séricos de MDA em pacientes recebendo tratamento dialítico CAPD ou HD, quando comparados com indivíduos controle.

Como se pode observar, a grande maioria dos estudos avalia a lipoperoxidação através da técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os radicais livres atacam os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, resultando na formação de produtos da LPO, como dienos conjugados e malondialdeído (MDA), um dos componentes medidos pelo TBARS. O TBARS é um método bastante difundido, porém pouco sensível e específico. Muitos fatores, como composição dos ácidos graxos, quantidade de gordura e de antioxidantes, podem modificar essa reação (JANERO, 1990). Durante HD, ocorre influência de diversas substâncias, incluindo glicose, que podem afetar a reação com o TBA. Desse modo, é necessária a utilização de uma técnica mais sensível para melhorar a qualidade e acurácia nas determinações de lipoperoxidação nos doentes renais (HIRAYAMA et al., 2000; SCHETTLER et al., 1994). A determinação da lipoperoxidação neste trabalho foi feita através da técnica de quimiluminescência (QL). A determinação da lipoperoxidação por quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de

tert-butil se apresenta como um método de avaliação bastante sensível que tem sido aplicado para detectar a existência de estresse oxidativo associado com situações patológicas (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991).

Analisando os dados apresentados na Figura 3, observa-se que os valores da QL não foram modificados pela sessão de HD e que os mesmos permaneceram inalterados por 48 horas. Isso sugere que não há aumento adicional nos níveis de LPO durante os tempos avaliados.

Acredita-se que um caminho compartilhado por ambos, hemodiálise e uremia, seja a amplificação das respostas inflamatórias, uma vez que o aumento do estresse oxidativo tem sido descrito em todos os estágios da doença renal. Um estímulo disparador inicial poderia provocar a produção de citocinas inflamatórias ou aumento das EAO, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio. Associada a isso, a falta de defesas antioxidantes para encerrar ou diminuir essa resposta amplificada, poderia levar a um crônico ciclo vicioso de radicais livres, causando produção de mediadores inflamatórios que voltam a estimular a produção desses radicais livres. Essa produção crônica pode lesar proteínas, lipídios de membrana e DNA, mantendo altos os índices de estresse oxidativo nesses pacientes (WRATTEN et al., 2000).

Produtos da oxidação de proteínas (DAVIES, 1987; WITKO-SARSAT & DESCAMPS-LATSCHA, 1997; DESCAMPS-LATSCHA & WITKO-SARSAT, 2001; DESCAMPS-LATSCHA et al., 2001; LEVINE, 2002) e produtos da oxidação de bases de DNA (TARNG et al., 2000) também têm sido sugeridos como importantes índices de estresse oxidativo. A formação de carbonilas representa um marcador precoce da oxidação de proteínas; envolve cátions do ciclo redox, como ferro e cobre, os quais têm locais de ligação em proteínas e podem transformar resíduos de aminoácidos em carbonilas na presença de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. Os aminoácidos lisina, arginina,

prolina e histidina são os mais propensos para gerar carbonilas (DESCAMPS-LATSCHA & WITKO-SARSAT, 2001). Essa linha de estudo indica que a mensuração de proteínas oxidadas pode ter algumas vantagens na comparação com produtos da lipoperoxidação por sua formação ser relativamente precoce e pela relativa estabilidade desses compostos (ERDOGAN et al., 2002). Tem sido estabelecido que as proteínas representam alvos para a injúria mediada por oxidantes. O ataque de espécies ativas de oxigênio às proteínas pode levar a alterações funcionais e, em particular, à perda progressiva de suas propriedades metabólicas, enzimáticas ou imunológicas (DESCAMPS-LATSCHA & WITKO-SARSAT, 2001).

A concentração de carbonilas, gerada por diferentes mecanismos, é uma excelente medida de oxidação de proteínas mediada por EAO. Um grande número de métodos com alta sensibilidade têm sido desenvolvidos para avaliar grupos de proteínas oxidadas (VALKO et al., 2007).

Neste estudo, os dados referentes às carbonilas não foram modificados por um período de até quarenta e oito horas após uma sessão de HD.

Quando se observa o comportamento dos níveis de nitritos no plasma dos indivíduos avaliados, Figura 6, verifica-se que houve um aumento significativo imediatamente após a HD e que esse aumento nos níveis de nitritos se manteve assim 24h após a HD. Porém, quando se avaliaram os níveis de nitritos 48h após a HD, observou-se uma redução nos mesmos, atingindo novamente os níveis observados no início da avaliação, ou seja, antes da sessão de HD.

O óxido nítrico (NO), também conhecido como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) é um gás hidrofóbico envolvido no controle do tônus vascular, promovendo vasodilatação, e, na inibição de alguns processos, como agregação plaquetária, adesão de leucócitos ao endotélio, produção de endotelinas (peptídeos com

potente ação vasoconstritora). O NO é liberado quando ocorre aumento no fluxo sanguíneo, aumento do estresse de cisalhamento (*shear stress*) e aumento da pressão arterial, provocando relaxamento dos vasos. Este é um mecanismo de adaptação que contribui para manter a pressão arterial em valores normais. Um aumento na produção de EAO, como o superóxido, peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos, além da diminuição da síntese de NO, foi observado em pacientes com hipertensão quando comparados a indivíduos normais. Esses indivíduos com hipertensão arterial ainda apresentam diminuídas concentrações de antioxidantes, tais como a vitamina E e SOD (KUMAR & DAS, 1993).

Em hipertensão por doença renal crônica, foi observada uma inibição na síntese de NO (KUO & SCHROEDER, 1995). Porém, quando esses pacientes são submetidos à sessão de HD, um aumento de NO pode estar sendo induzido pelo aumento do fluxo sanguíneo e estresse de cisalhamento a que o sangue é submetido durante o procedimento. Esse aumento de NO, juntamente com a perda de volume, parece ser um dos responsáveis pela hipotensão apresentada pelos pacientes durante HD. O radical superóxido circulante pode reagir com o NO, inativando-o e formando peroxinitrito (ONOO^-), que é um produto tóxico altamente oxidante. O decaimento espontâneo do peroxinitrito pode levar à formação de nitrito e radical hidroxil (DENICOLA, 1995). Este mecanismo pode explicar o aumento significativo nos níveis de nitritos observado nos doentes renais após sessão de hemodiálise.

Apesar do aumento nos níveis de nitritos após a sessão de HD, não se observou aumento nos níveis de lipoperoxidação e de carbonilas após o procedimento. Isso poderia estar sendo combatido pelo sistema antioxidante enzimático, principalmente da enzima superóxido dismutase que teve aumento significativo de sua atividade após a sessão de HD. O aumento da atividade da SOD teve seu pico imediatamente após a HD, porém sua

atividade permaneceu aumentada por até 48h após o procedimento, quando a intensidade dessa atividade já atingia valores próximos dos encontrados antes da HD.

O padrão do aumento nos níveis de nitritos se parece muito com o encontrado na atividade da SOD; provavelmente, a atividade dessa enzima antioxidante se manteve alta enquanto os níveis do ânion radical superóxido também estavam aumentados na circulação. Por isso, o aumento nos níveis de nitritos que também reduziram 48h após a HD.

Em estudo prévio realizado pelo grupo, avaliaram-se os efeitos de uma sessão de hemodiálise sobre o estresse oxidativo de doentes renais crônicos; naquele momento, os pacientes foram avaliados antes e imediatamente após uma sessão de hemodiálise. Observou-se que, apesar de os níveis de nitritos estarem aumentados após a hemodiálise, dados confirmados nesta pesquisa, não houve aumento nos níveis de lipoperoxidação e de carbonilas após o procedimento. Uma das hipóteses levantadas é que uma única sessão de hemodiálise, em função do pequeno espaço de tempo entre seu início e fim, não seria suficiente para se detectar o dano causado por esses radicais, já que se observou aumento nos níveis de nitritos, permitindo inferir o aumento nos níveis do radical hidroxil (BIANCHI, 2003).

Neste estudo, os pacientes foram acompanhados por um período maior de tempo, ou seja, até 48h após sessão de HD. Confirmaram-se os dados referentes ao dano oxidativo observado. Assim, uma sessão de hemodiálise, utilizando membrana de acetato de celulose, não modifica o dano oxidativo a lipídios e proteínas por um período de até 48h.

Portanto, o aumento da atividade da SOD e dos níveis de nitritos provavelmente ocorreram devido ao aumento do substrato radical superóxido. O aumento deste levaria ao aumento na produção de peroxinitrito. Apesar disso, não foi observado

aumento na LPO ou nos níveis de carbonilas. Talvez, nos tempos avaliados, não tenha sido possível detectar maiores repercussões; além disso, pode ter ocorrido que alguma defesa antioxidante não avaliada esteja aumentada após a HD.

Doentes renais crônicos têm fatores de risco para complicações cardiovasculares marcadamente aumentados, quando comparados com a população em geral. Além dos fatores de risco tradicionais, como hiperlipidemia e fumo, uma série de fatores adicionais específicos para essa população são implicados, como anemia, hiperhomocisteinemia, hiperfosfatemia, calcificação vascular, inflamação e estresse oxidativo. A sobrecarga de ferro tem sido sugerida como um item adicional nos fatores de risco cardiovascular para a população em geral. (KLENTZMAYER & HÖRL, 2002; GREKAS et al., 2005).

A anemia está presente na maior parte dos pacientes com insuficiência renal crônica. Quando não tratada, a anemia presente na IRC está associada a diversas anormalidades fisiológicas, incluindo diminuição da oferta e utilização de oxigênio pelos tecidos, aumento do débito cardíaco, hipertrofia ventricular, calcificação arterial, angina, insuficiência cardíaca congestiva, diminuição da acuidade mental e cognitiva. Em crianças, ela está associada a retardo do crescimento e, em adultos, à diminuição na sobrevida, qualidade de vida, reabilitação social e profissional (GALETTA et al., 2006; CIVILIBAL, et al., 2006).

O principal fator envolvido na anemia da IRC é a deficiência absoluta ou relativa de eritropoetina, que é uma glicoproteína produzida principalmente no rim. Esse hormônio interage com receptores de alta e baixa afinidade presentes nas células responsivas, que são os precursores eritróides. A disponibilidade de eritropoetina recombinante humana (ERH) possibilitou um importante avanço no tratamento da anemia na IRC. Melhora na qualidade de vida, aumento da capacidade física, diminuição da

insônia, melhora na função sexual, apetite, funções cognitivas e funções cardiorrespiratórias têm sido repetidamente demonstradas (BARROS et al., 1999).

Com exceção do transplante renal bem sucedido, o tratamento com eritropoetina tem se mostrado a melhor terapia para tratamento da anemia na IRC. A suplementação com ferro é praticamente obrigatória, sendo necessária sua administração, em geral, por via parenteral. Por esta via, é proposta a administração de 100 mg de ferro intravenoso a cada diálise por nove a dez sessões, medindo-se os parâmetros do metabolismo do ferro após duas semanas e repetindo, se necessário. Quando a suplementação de ferro é feita por via oral, pelo menos 200 mg de ferro devem ser administrados diariamente, em doses divididas e fora das refeições. Uma vez alcançado o hematócrito-alvo, as doses de manutenção ficam entre 25 e 100 mg/semana em pacientes em HD (BARROS et al., 1999).

A introdução da eritropoetina recombinante humana possibilitou a elevação do hematócrito e da hemoglobina dos pacientes com insuficiência renal crônica, demonstrando que a falta desse hormônio era, de fato, o mais importante componente fisiopatogênico da anemia nesses pacientes (THOMÉ, 2000).

O ótimo gerenciamento da anemia, usualmente, requer terapia com eritropoetina, melhorando a vida dos pacientes com doença renal em estágio final. Enquanto mortalidade, hospitalizações e qualidade de vida dos pacientes se correlacionam com níveis de hemoglobina e hematócrito, aumentar a dose de eritropoetina, para superar a deficiência funcional de ferro, não é o caminho ideal. Altas doses de eritropoetina podem afetar níveis de fatores de crescimento e podem ser associadas a disfunção vascular, levando à hipertensão. Em adição, a deficiência funcional de ferro claramente limita a capacidade da eritropoetina em apoiar a eritropoiese, assim, a suplementação com ferro tem um custo benefício associado à redução da dose requerida de eritropoetina. Contudo, o

uso de ferro parenteral pode produzir sobrecarga de ferro e potencializar um aumento do estresse oxidativo induzindo à doença cardíaca (BESARAB, 1999).

O ferro potencialmente influencia doenças cardiovasculares nos doentes renais terminais e pode inibir ou promover doença cardiovascular. Primeiro, a anemia pode aumentar o risco de doença cardiovascular por promover hipertrofia ventricular esquerda, e a suplementação com ferro tem mostrado, de forma convincente, aumentar a eficácia da terapia com eritropoetina para o tratamento da anemia (KLENTZMAYER & HÖRL, 2002).

Apesar da reposição oral de ferro ser simples e barata, sendo sulfato ferroso a formulação disponível mais comum, existe a necessidade de duas a três doses diárias com o estômago vazio, características que levam a efeitos gastrintestinais, como intolerância digestiva, constipação, etc (THOMÉ, 2000). Além disso, a absorção do ferro em urêmicos é controversa. Em um estudo realizado por Dittrich et al. (2000) os níveis séricos de ferro estavam aumentados em pacientes em CAPD recebendo suplementação oral de ferro. A absorção de ferro era significativamente maior naqueles pacientes com deficiência absoluta de ferro, ou seja, com ferritina sérica $< 100 \mu\text{g/l}$, que naqueles pacientes com deficiência funcional de ferro, ferritina $>100 \mu\text{g/l}$, mas com saturação de transferrina $< 20\%$. Os pacientes com ferritina $>100 \mu\text{g/l}$ e saturação de transferrina $>20\%$ apresentaram baixa absorção de ferro.

Kooistra et al. (1998) observaram que a absorção intestinal de ferro era dependente, nos pacientes em HD, dos níveis de ferro que os mesmos apresentavam, e que esta absorção dependia da presença ou ausência de infecção.

Um estudo comparando a suplementação de ferro oral e intravenosa de pacientes com insuficiência renal progressiva e anemia tratada com eritropoetina, indicou que ambas as formas de suplementação resultaram em aumento dos níveis de hemoglobina,

porém somente a suplementação intravenosa aumentou os níveis de ferritina (STOVES, 2001).

Nos pacientes em HD, a absorção intestinal de ferro é significativamente baixa, tanto naqueles com deficiência de ferro quanto em pacientes com níveis normais, se comparados com pacientes não urêmicos. Portanto, para esses pacientes, a terapia com ferro intravenoso tem sido recomendada (KOOISTRA et al., 1998; AHSAN, 1998).

Recentemente, foi descrito o papel da hepcidina no metabolismo do ferro. Esse peptídeo é produzido no fígado por estímulo de citocinas pró-inflamatórias, impedindo a absorção intestinal de ferro e também a liberação dos estoques orgânicos (WEISS & GOODNOUGH, 2005).

A suplementação com ferro sobre a otimização da terapia com eritropoetina recombinante humana é reconhecida, mas é também indicada para aqueles pacientes que não fazem esse tratamento, o que ocorre normalmente por razões econômicas. O ferro suplementar deve ser administrado para impedir a deficiência e manter as reservas para conseguir níveis de hemoglobina entre 11 g% e 12 g%. Para manter hematócrito acima de 33%, a maioria dos pacientes em HD deverá requerer a administração venosa regular de ferro. A maioria dos pacientes conseguirá um hematócrito entre 33% e 36%, com saturação de transferrina menor do que 50% e ferritina menor do que 800 ng/ml (THOMÉ, 2000).

As diretrizes para tratamento da anemia renal da *National Kidney Foundation-Dialysis Outcomes Quality Initiative* (NFK-DOQI) recomendaram o uso do ferro intravenoso para prevenir a deficiência de ferro e dar suporte à eritropoiese. Salientou-se, todavia, que o uso de ferro parenteral pode produzir sobrecarga de ferro, potencializando o estresse oxidativo e induzindo a doenças cardíacas.

A anemia, por si só, pode levar ao aumento da lipoperoxidação nesses pacientes. Um estudo realizado por Ludat et al. (2000) observou que os níveis plasmáticos

de produtos da lipoperoxidação, como o MDA, se correlacionavam com a severidade da anemia renal em pacientes em tratamento hemodialítico. Verificou também que, após correção da anemia renal com eritropoetina recombinante humana, níveis significativamente baixos de MDA eram observados, quando comparados com pacientes anêmicos em hemodiálise. Esse estudo mostrou que esses resultados só foram possíveis com a correção completa da anemia. Os dados obtidos por esses pesquisadores apontam a anemia como um dos mecanismos causadores do estresse oxidativo nesses pacientes.

A anemia renal também está associada com tolerância reduzida ao exercício e ao aumento do trabalho respiratório, por um aumento do metabolismo anaeróbico devido à hipóxia e isquemia decorrentes da anemia que limitam a capacidade sangüínea do paciente em carrear oxigênio (LEWIS et al., 1992).

O estresse oxidativo reflete um desequilíbrio entre geração de espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio e os mecanismos de defesa antioxidante. Em condições inflamatórias, o superóxido gerado por leucócitos reduz o íon férrico (Fe^{3+}), para íon ferroso (Fe^{2+}). O Fe^{2+} , via reação de Fenton, catalisa a produção do radical hidroxil, uma espécie ativa de oxigênio com grande potencial de dano. Quando formados, os radicais livres podem atacar todas as classes de moléculas, especialmente as membranas lipídicas, para formar radicais livres derivados de lipídios. Esses podem voltar a gerar radicais livres adicionais, estabelecendo uma reação em cadeia (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Portanto, a suplementação intravenosa de ferro é uma condição propícia para a geração de radicais livres. Associando-se a isso, as toxinas urêmicas, o estado pró-inflamatório dos mesmos e, principalmente, a redução na atividade de antioxidantes enzimáticos e concentração de antioxidantes não enzimáticos, que promovem importante defesa contra radicais livres, parecem ser os principais responsáveis pelo estresse oxidativo apresentado por esses pacientes.

Os pacientes renais avaliados durante este estudo apresentaram hematócrito (%) $34,1 \pm 1,12$, e hemoglobina (g dL) $11,0 \pm 0,38$, e receberam suplementação de 100 mg de hidróxido de Fe III, (Noripurum), diluído em 50 mL de soro fisiológico, por via endovenosa, nos trinta minutos finais da hemodiálise. A suplementação com ferro foi realizada a cada quinze dias, com o objetivo de manter os níveis de hematócrito o mais próximos possível de 36%, e os níveis de hemoglobina em torno de 12%. Pode-se observar que uma dose isolada de 100 mg de Fe III não repercutiu em aumento nos níveis de dano a lipídios e proteínas nos pacientes avaliados até 24h após a suplementação.

Salienta-se que, durante esta pesquisa, foram avaliadas quatro sessões distintas com suplementação de ferro e nenhuma repercutiu em aumento do dano oxidativo. Durante este trabalho, pôde-se observar o mesmo comportamento do estresse oxidativo após suplementação com ferro em todas as avaliações. Os níveis de QL e carbonilas, 24h após a suplementação com ferro, não foram modificados de forma significativa, comprovando que a suplementação de ferro na dose utilizada neste estudo não potencializou o estresse oxidativo apresentado pelos doentes renais crônicos.

O estudo realizado por Tiranathanagul et al. (2004) avaliou o efeito da suplementação intravenosa de ferro (100 mg), sendo esta realizada de forma lenta, com uma hora de infusão, ou de forma rápida, realizada através de injeção com duração de cinco minutos. Marcadores de estresse oxidativo foram avaliados tanto no plasma quanto nos eritrócitos, através do TBARS expresso em MDA. Os autores não observaram diferenças entre as duas formas de suplementação. Foram avaliadas, também, a capacidade antioxidante total e a vitamina E. Aí também não foram observadas diferenças significativas. Quando os autores compararam os efeitos das diferentes formas de suplementação de ferro com uma sessão em que não houve suplementação, verificaram que não houve diferenças estatísticas em todas as variáveis estudadas.

Um estudo realizado com universitárias teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com ferro; os níveis de hidroperóxidos lipídicos e os níveis de carbonilas plasmáticas foram mensurados. As participantes foram divididas em dois grupos, o grupo que apresentava adequados níveis de ferro e o grupo com deficiência de ferro, mas que não apresentava anemia. Não houve diferenças entre os grupos após oito semanas de suplementação oral diária de 160 mg de sulfato ferroso. Os autores concluíram que nem a deficiência de ferro-não-anêmica, nem seu tratamento com suplementação oral de ferro estão associados ao dano oxidativo observado no plasma de universitárias (GROPPER et al., 2003).

Os dados apresentados neste estudo mostram não haver modificações nos níveis de dano oxidativo com a suplementação com ferro, também não foi observada relação entre os níveis de ferritina e transferrina com níveis de lipoperoxidação e carbonilas. O sistema transferrina na corrente sanguínea promove uma redução do ferro livre circulante que pode permitir ao corpo a efetiva detoxificação de uma fração de ferro livre da formulação utilizada para a suplementação. A apotransferrina na corrente sanguínea (20 % de saturação de transferrina) pode, em adultos, detoxificar cerca de 6mg de ferro livre. Uma dose de 500 mg de ferro endovenoso contém cerca de 10 mg de ferro livre, excedendo a capacidade da transferrina em 4 mg. Essa quantidade de ferro livre pode vir a aumentar, de forma transitória, infecções e, também, os níveis de estresse oxidativo (HANDELMAN, 2003).

Um dos problemas observados é que as formulações apresentam, algumas vezes, variações importantes na quantidade de ferro livre. Doses pequenas de 50 a 100 mg são normalmente administradas nesses pacientes e parecem não contribuir para o aumento do estresse oxidativo. Contudo, doses elevadas, geralmente superiores a 500 mg, podem

representar risco por contribuir com doses relativamente grandes de ferro livre (HANDELMAN, 2003).

Além de não ser observado, neste estudo, aumento do dano oxidativo, não se observou modificação significativa na atividade das enzimas antioxidantes avaliadas com a administração de ferro. Um estudo em que foi realizada suplementação com ferro intravenoso, num total de 625 mg, mostrou aumento da lipoperoxidação pelo aumento nos níveis de MDA, mas a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e GPx não apresentou diferença significativa (MIMIC-OKA et al., 2005).

Portanto, a suplementação de 100 mg de sacarato de hidróxido de ferro III, utilizada neste estudo, não parece ser a responsável pelos altos níveis de estresse oxidativo observados nesses pacientes.

O aumento do estresse oxidativo durante a HD agrava a anemia urêmica, reduzindo as células sanguíneas vermelhas e o efeito da eritropoetina recombinante humana, aumentando a susceptibilidade à hemólise nos doentes renais crônicos (LUDAT et al., 2000).

A biocompatibilidade das membranas de diálise parece ter papel fundamental no resultado da HD sobre a mortalidade dos pacientes. A taxa de mortalidade é mais alta com membranas de celulose quando comparada com as membranas de celulose modificadas e ou membranas sintéticas (MOURAD et al., 2004).

Como pode-se observar na Figura 3, uma única sessão de hemodiálise utilizando membrana do tipo celulose modificada, que é um tipo de membrana biocompatível, não é a causa do aumento de estresse oxidativo apresentado pelos doentes renais em tratamento com hemodiálise, pois não houve variação significativa nos níveis de lipoperoxidação e das carbonilas até 48h após a sessão de HD.

O processo inflamatório induz ao aumento da produção de espécies ativas de oxigênio, levando ao consumo de antioxidantes solúveis e, posteriormente, à lipoperoxidação e oxidação de LDL. O processo inflamatório observado nos pacientes deste estudo, pelos altos níveis de proteína reativa C, e o estresse oxidativo, observado pelos níveis aumentados de QL e carbonilas, vão atuar sinergicamente em um ciclo vicioso, levando eventualmente à aterosclerose acelerada (NGUYEN-KHOA, 2001). Sabe-se que pacientes renais crônicos desenvolvem aterosclerose mais precocemente que a população em geral e que, além disso, cerca de 50% desses pacientes morrem devido a complicações cardiovasculares (KLETZMAYR & HÖRL, 2002; BESARAB, 1999).

Nos últimos anos, a inflamação sistêmica tem sido considerada um fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, tanto na população em geral como para os doentes renais em fase final da doença, adultos ou crianças (ECE et al., 2006). Papagianni et al. (2003) demonstraram uma associação significativa entre espessura da camada médio-íntima da carótida e valores de proteína reativa C. Os níveis de proteína reativa C também mostraram ser um marcador valioso para dano vascular por aterosclerose.

A proteína reativa C, um marcador de inflamação e marcador de risco para doenças cardiovasculares, pode contribuir para a aterosclerose. O α – tocoferol tem mostrado ser um redutor dos níveis de proteína reativa C em pacientes com doenças cardiovasculares e naqueles com fatores de risco para essas doenças (THABET & CHAN, 2006).

Estudo realizado por Ece et al. (2006) observou altos níveis de citocinas, proteína reativa C e fibrinogênio em crianças com doença renal crônica, quando comparadas com indivíduos saudáveis. A fase aguda da inflamação é caracterizada por um aumento na síntese de proteínas da fase aguda, como a proteína reativa C e fibrinogênio;

normalmente, as respostas a esta fase duram apenas alguns dias; nos casos de inflamação crônica, grandes quantidades dessas proteínas continuam a serem produzidas e podem contribuir para o desenvolvimento de dano tecidual, incluindo complicações cardiovasculares.

Apesar de as doenças cardiovasculares serem a maior causa de morbidade e mortalidade nos doentes renais, não está claro se ela ocorre devido ao procedimento de hemodiálise ou se a uremia, por si só, já é suficiente para aumentar esse risco.

Um estudo avaliou, através de ultrassonografia, a espessura da camada médio-intima das artérias carótidas em trinta pacientes urêmicos antes de os mesmos iniciarem tratamento com hemodiálise e comparou-os com 26 indivíduos controles. Os grupos eram semelhantes nas variáveis, idade, sexo, presença de hipertensão, dislipidemia e tabagismo. Os níveis de colesterol total, triglicérides, HDL, fibrinogênio e cálcio total também foram avaliados. Os pacientes urêmicos apresentaram altos níveis de fibrinogênio, fósforo inorgânico e triglicéridios. Os autores observaram que doentes renais, antes mesmo de iniciarem HD, apresentavam valores de espessura da camada médio-intimal das carótidas superiores aos observados nos controles. A espessura da parede das carótidas apresentou correlação significativa de acordo com a idade e sexo masculino e, ainda, níveis altos de triglicéridios nos pacientes urêmicos. Nos controles, somente a idade mostrou correlação significativa com os valores da espessura da camada médio-intima. Os autores sugerem que níveis elevados de triglicéridios indicam a necessidade de intervenções terapêuticas, objetivando minimizar esse risco (DURSUN et al., 2006).

Níveis elevados de proteína reativa C aceleram a progressão da aterosclerose não somente na população em geral, mas também nos pacientes em hemodiálise. Embora mais recentemente o interesse tenha sido focado num possível papel central da inflamação na fisiopatologia da aterosclerose, sabe-se pouco sobre os fatores que iniciam a inflamação.

Diferente da população em geral, na qual a elevação dos níveis de proteína reativa C pode se refletir na inflamação vascular crônica e aumentar o risco de eventos vasculares, pacientes mantendo HD estão sujeitos a múltiplos estímulos inflamatórios não vasculares, incluindo infecções crônicas e, até mesmo, elementos do aparato para o procedimento de diálise (HASE et al., 2006).

Já é conhecido que a inflamação está presente em 35 a 65% dos pacientes em diálise e está associada com a presença de aterosclerose. Valores de proteína reativa C elevados, maiores que 10 mg/l, são preditivos de mortalidade por doença cardiovascular tanto em pacientes que realizam hemodiálise quanto nos pacientes em tratamento com diálise peritoneal. Além da aterosclerose, outras condições também têm levado à elevação dos níveis de proteína reativa C, como infecção aguda ou crônica e outras doenças sistêmicas. A dosagem desta proteína, quando realizada uma única vez, ou com medidas repetidas, sendo observados níveis elevados, está relacionada à mortalidade de pacientes em diálise, por doença cardiovascular e também por outros tipos de doenças (ELZEN et al., 2006).

O estudo realizado por Bayes et al. (2006) acompanhou, durante quatro anos, 94 pacientes estáveis em HD, observando principalmente os níveis de proteína reativa C e LDL oxidado. Os autores observaram uma correlação positiva entre proteína reativa C e a idade dos pacientes. Com relação aos fatores de risco, demonstraram que a idade, o LDL oxidado e a albumina foram preditores de mortalidade por doença cardiovascular no período do trabalho. A concentração sérica de proteína reativa C não foi um bom preditor de mortalidade, apesar dos altos níveis observados no estudo, possivelmente por sua relação positiva com a idade.

A prevalência das anormalidades na composição das lipoproteínas nos doentes renais crônicos é maior que na população em geral e pode contribuir para aumentar os

fatores de risco para as doenças cardiovasculares nesses pacientes (WANNER, 2000). O tratamento da doença renal com HD agrava o perfil lipídico nessa população, porém o tratamento com CAPD não apresentou os mesmos resultados. Os pacientes avaliados foram acompanhados por um período de seis meses (DIEPEVEEN et al., 2005).

A grande maioria dos trabalhos apresenta a teoria da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade como um dos principais eventos no desenvolvimento da aterosclerose. Porém, Jurek et al. (2006) observaram que o LDL era mais resistente em pacientes em CAPD, quando comparados com sujeitos controles ou em tratamento hemodialítico; nesses pacientes, também, os autores observaram um estímulo maior para a geração de espécies ativas de oxigênio em granulócitos. Além disso, a habilidade do HDL em proteger o LDL da oxidação apresentava-se reduzida. A partir dos resultados, os autores sugerem que o risco dos pacientes renais para desenvolver aterosclerose não está relacionado com a redução da resistência do LDL à oxidação, mas, sim, com a redução da capacidade antioxidante do HDL.

A hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha importante papel na patogênese da aterosclerose despertou crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. De acordo com a hipótese oxidativa, as vitaminas, por terem propriedades lipofílicas (vitaminas A, D, E e K), exerceriam o seu efeito antiaterogênico através de sua incorporação à partícula de LDL, tornando-a menos sensível à oxidação e, conseqüentemente, menos digerível pelos macrófagos, reduzindo a formação de células espumosas. Os antioxidantes mais investigados são o alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (precursor da vitamina A), ácido ascórbico, que é uma vitamina com propriedade hidrossolúvel (vitamina C), flavonóides e probucol (BATLOUNI, 1997).

Os dados apresentados pelo estudo duplo-cego, randomizado e controlado com placebo, sobre os efeitos da vitamina E em pacientes com cardiopatia isquêmica

sintomática e com doença cardiovascular comprovada, *Cambridge Heart Antioxidant Study* (CHAOS), com os pacientes sendo acompanhados por um período de 510 dias, avaliaram como positiva a suplementação com este antioxidante. Os pacientes foram divididos em três grupos. 1035 pacientes receberam vitamina E e foram divididos em dois grupos: um grupo com 546 pacientes que receberam a dose de 800 UI/dia e o segundo grupo, com 489 pacientes, que receberam, no mesmo período, 400 UI/dia de vitamina E. O grupo controle composto por 967 pacientes recebeu cápsulas de placebo. No grupo tratado, houve redução significativa do risco combinado de morte cardiovascular e infarto não fatal em relação ao grupo placebo. Porém, a mortalidade cardiovascular não foi diferente estatisticamente entre os grupos estudados. Para os autores, a vitamina E reduziu significativamente o risco de infarto não fatal, sendo os benefícios consideráveis após um ano de tratamento (STEPHENS et al., 1996).

Um estudo realizado por Diepeveen et al. (2005) tinha como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com atorvastatina, alfa-tocoferol e a combinação de ambos, nas lipoproteínas e estresse oxidativo de pacientes em diálise. O tratamento com atorvastatina foi efetivo na redução do colesterol total, triglicerídeos, LDL e LDL oxidado. A suplementação adicional de vitamina E não teve efeito no perfil lipídico e na oxidação do LDL, porém a suplementação de alfa-tocoferol associado à atorvastatina teve efeito *in vitro* na oxidação do LDL.

O alfa-tocoferol, por ser a forma de maior capacidade antioxidante, é mais utilizado nos estudos com humanos e também nos estudos com modelos animais (THABET & CHAN, 2006).

Uma das discussões a respeito da suplementação com vitamina E está relacionada com a dose utilizada. A dose varia bastante entre os estudos, assim como os seus efeitos. O estudo HOPE, realizado com 9541 pacientes, utilizou 400 UI/dia. Já no

estudo GISSI, a dose utilizada foi de 300 mg/dia; este estudo foi realizado com 11324 pacientes e teve duração de três anos e meio. Nas doses 300 e 400 UI/dia, não foram observados efeitos (YUSUF et al., 2000; GISSI, 1999). Outros grandes estudos, porém, realizados com doses de vitamina E superiores aos estudos citados anteriormente, como o CHAOS, realizado com 2002 pacientes, utilizou 400 ou 800 UI/dia, e o estudo SPACE, 800 UI/dia. Nesses estudos, em que as doses de suplementação com vitamina E foram elevadas, os efeitos observados foram considerados positivos (STEPHENS et al., 1996; BOAZ et al., 2000).

Uma das grandes discussões sobre a dose utilizada baseia-se em que o alfa-tocoferol, quando atua como antioxidante, é convertido em radical tocoferil. Se não reduzido por um co-antioxidante, como por exemplo vitamina C, o radical tocoferil pode reagir com lipídios e gerar radicais lipídicos, portanto altas doses de vitamina E poderiam apresentar um risco pró-oxidativo para os pacientes. Em virtude disso, alguns autores têm sugerido o uso concomitante de vitamina C e vitamina E (YU, 1994).

Embora a reação de Fenton ocorra facilmente *in vitro*, sua ocorrência em condições fisiológicas é pouco provável em virtude da pequena disponibilidade de ferro livre catalítico. Normalmente, os níveis de ferro livre são baixos devido a seu seqüestro por proteínas, como a ferritina e a transferrina. Contudo, pacientes com níveis elevados de ferro devido à suplementação podem ter alta concentração de ferro livre e, nesses casos, o excesso de vitamina C poderia apresentar efeitos deletérios. Os níveis de vitamina C tecidual devem, pois, ser mantidos baixos e a suplementação com vitamina C deve ser evitada (FRAGA & OTEIZA, 2002).

Um estudo realizado com gestantes demonstrou que a suplementação combinada de 100 mg de fumarato e 500 mg de ascorbato, durante o terceiro trimestre de gestação, causou um aumento de 20% na oxidação lipídica avaliada no plasma (LACHILI

et al., 2001). Porém, é importante ressaltar que diversos outros estudos, tanto em modelos animais como em humanos, avaliaram como positiva a suplementação com vitamina C. Esses estudos não evidenciaram aumento do estresse oxidativo devido à ingestão combinada de ferro e vitamina C (EISELT et al., 2001; PROTEGGENTE et al., 2000; CHEN et al., 2000).

Além da suplementação com vitamina E via oral, membranas de diálise específicas, modificadas com vitamina E, têm sido utilizadas, para tentar impedir o estresse oxidativo apresentado pelos pacientes em HD. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados para avaliar os efeitos da membrana modificada nos marcadores periféricos de estresse oxidativo (SOSA et al., 2006).

O trabalho realizado por Morimoto et al. (2005) avaliou a dimetilarginina assimétrica (ADMA), que é um inibidor endógeno da enzima óxido nítrico sintase e um preditor independente de alta mortalidade em hemodiálise. Este estudo comparou os efeitos de uma membrana modificada com vitamina E com os efeitos de uma membrana não modificada. Os resultados mostraram que o uso da membrana modificada com vitamina E resultou em redução significativa dos níveis de ADMA, indicando que esse tipo de tratamento exerce atividade antioxidante.

Existe um paradoxo entre as dramáticas respostas com suplementação de vitamina E em alguns estudos e a falta de eficácia comprovada em outros. Acredita-se que a grande quantidade de variáveis, como a natureza e dosagem da vitamina E, tempo de terapia, estágio da doença, idade dos pacientes e grau de insuficiência renal, entre outros fatores, podem ser as responsáveis pela grande variabilidade dos resultados obtidos. O estágio da doença é um dos fatores que podem influenciar, de forma direta, os efeitos da suplementação com vitamina E. Acredita-se que a vitamina E pode ser mais efetiva nos estágios mais precoces da doença do que em estágios mais avançados, sendo esses, na

maioria das vezes, irreversíveis. A habilidade da vitamina E em inibir a oxidação do LDL *in vitro* tem servido como base para assumir ou supor que esta também é capaz de inibir eventos aterogênicos em fase inicial (THABET & CHAN, 2006). Além de seu poder lipofílico antioxidante, a vitamina E contribui para regular processos, como atividade metabólica, proliferação e morte em diferentes tipos de células (GIRAY et al., 2003).

A adição da vitamina E, como antioxidante, com o objetivo de prevenir os efeitos deletérios da uremia em pacientes terminais em tratamento hemodialítico, deve ser encorajada, pois os resultados desse estudo mostram que pacientes renais crônicos em hemodiálise estão propensos a apresentar estresse oxidativo, e que apenas uma sessão de diálise não potencializa esse efeito. Este estudo demonstra que a capacidade antioxidante enzimática está reduzida e que os pacientes apresentam um quadro de inflamação crônica. Estima-se que o enfraquecimento das defesas antioxidantes aumenta a susceptibilidade desses pacientes em produzir espécies ativas de oxigênio, aumentando os níveis de substratos oxidados.

Avaliando o efeito das doses utilizadas neste estudo, observou-se uma redução maior do dano oxidativo a lipídios e proteínas com 800 mg/dia/trinta dias, maior dose utilizada, do que o observado após a suplementação com 400 mg/dia/trinta dias. Os dados obtidos com este estudo nos levam a aceitar que doses mais elevadas são mais eficientes no combate ao estresse oxidativo nos doentes renais crônicos e que as doses utilizadas neste trabalho não apresentaram risco para esses pacientes. Os dados apresentados neste trabalho demonstram claramente que a vitamina E administrada por via oral é uma opção eficaz na redução do estresse oxidativo dos pacientes em hemodiálise e que, quando utilizada de forma crônica, na dose de 800 mg/dia, os efeitos foram os mais significativos, sendo observados os níveis mais baixos de lipoperoxidação após o uso contínuo dessa dose por um período de trinta dias.

6. CONCLUSÕES

Observando os dados obtidos com este trabalho, pode-se concluir que a doença renal crônica é caracterizada por um estado oxidativo, com níveis elevados de dano a lipídios e proteínas e reduzida atividade das enzimas antioxidantes e que uma única sessão de hemodiálise não modifica essa realidade.

Após avaliar os efeitos da suplementação com ferro para tratamento da anemia, pode-se concluir que a suplementação com 100 mg de hidróxido de ferro III não modificou os níveis de dano oxidativo a lipídios e proteínas observados nos pacientes.

A vitamina E, administrada por via oral na dose 400 mg/dia/trinta dias ou 800 mg/dia/trinta dias, reduziu significativamente os níveis de oxidação de lipídios e proteínas. Porém o uso contínuo de 800 mg/dia/trinta dias foi mais efetivo; com essa dose, os níveis de lipoperoxidação, obtidos após trinta dias de uso, foram significativamente mais baixos dos demais. Uma única dose de vitamina E, 800 mg, administrada previamente a uma sessão de hemodiálise, é suficiente para reduzir, de forma significativa, os níveis de lipoperoxidação e os níveis de oxidação a proteínas.

Assim, a vitamina E, devido a sua capacidade antioxidante, foi efetiva na redução do estresse oxidativo observado nos doentes renais crônicos em fase final da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENSUR, H. Tratamento substitutivo da função renal. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.65, p.81-83, 1995.

AEBI Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

AHSAN, N. Intravenous infusion of total dose iron is superior to oral iron in treatment of anemia in peritoneal dialysis patients: a single center comparative study. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.9, p.664-668, 1998.

AKMAL, M.; SAWELSON, S.; KARUBIAN, F.; GADALLAH, M. The prevalence and significance of occult blood loss in patients with predialysis advanced chronic renal failure, or receiving dialytic therapy. **Clinical Nephrology**, v.42, p.198-202, 1994.

ASOYAMA, K.; SHIKI, Y.; HASEGOWA, O.; MIYAO, A.; HAYASHIBE, H.; DOBASHI, K.; KATO, K. Antioxidant enzymes and lipoperoxides in blood in uremic children and adolescent. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, p.105-109, 1990.

BARROS, E.; MANFRO, R.C.; THOMÉ, F.S.; GONÇALVES, L.F.S. **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. 627p.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.68, p.55-63, 1997.

BAYES, B.; PASTOR, M.C.; BONAL, J.; FORASTER, A.; ROMERO, R. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular mortality in haemodialysis-role of seniority and intravenous ferrotherapy: Analysis at 4 years of follow-up. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, p.984-990, 2006.

BAYLIS, C. Nitric oxide deficiency in chronic renal disease. **European Journal Clinical Pharmacology**, v.62, p.123-130, 2006.

BELLÓ-KLEIN, A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI, N.P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Editora da ULBRA, 2002, p.15-19.

BESARAB, A. Iron and cardiac disease in the end-stage renal disease setting. **American Journal of Kidney Diseases**, v.34, p.18-24, 1999.

BEUSTERIEN, K.M.; NISSENSON, A.R.; PORT, F.K.; KELLY, M.; STEINWALD, B.; WARE, J.E.Jr. The effects of recombinant human erythropoietin on functional health and well-being in chronic dialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.7, p.763-773, 1996.

BIANCHI, P.D. **Avaliação da Função Pulmonar e Estresse Oxidativo em Pacientes com Insuficiência Renal Crônica em Hemodiálise**. 2003, 110 f. Dissertação (Mestrado

em Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BLUM, M.; YACHNIN, T.; WOLLMAN, Y.; CHERNIHOVSKY, T.; PEER, G.; GROSSKOPF, I.; KAPLAN, E.; SILVERBERG, D.; CABILI, S.; IAINA, A. Low nitric oxide production in patients with chronic renal failure. **Nephron**, v.79, p.265-268, 1998.

BOAZ, M.; MATAS, Z.; BIRO, A.; KATZIR, Z.; GREEN, M.; FAINARU, M.; SMETANA, S. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. **Kidney International**, v.56, p.1078- 083, 1999.

BOAZ, M.; SMETANA, S.; WEINSTEIN, T.; MATAS, Z.; GAFTER, U.; LAINA, A.; KNECHT, A.; WEISSGARTEN, Y.; BRUNNER, D.; FAINARU, M.; GREEN, M.S. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. **The Lancet**, v.356, p.1213-1218, 2000.

CANZIANI, M.E.F. Complicações da anemia na insuficiência renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.22, p.13-14, 2000.

CANZIANI, M.E.F.; BASTOS, M.G.; BREGMAN, R.; PECOITS, R.F.; TOMIYAMA, C.; DRAIBE, S.A.; CARMO, W.B.; RIELLA, M.C.; ROMÃO, J.E.Jr.; ABENSUR, H. Deficiência de ferro e anemia na doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.28, p.86-90, 2006.

CARR, A.; McCALL, M.R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.20, p.1716-1723, 2000.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v.59, p.527-625, 1979.

CHANG, C.H.; CHANG C.C; CHIANG, S.S. Reduction in erythropoietin doses by the use of chronic intravenous iron supplementation in iron-replete hemodialysis patients. **Clinical Nephrology**, v.57, p.136-141, 2002.

CHEN, K.; SUH, J.; CARR, A.C.; MORROW, J. D.; ZEIND, J.; FREI, B. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.279, p.1406-1412, 2000.

CIVILIBAL, M.; CALISKAN, S.; ADALETLI, I.; OFLAZ, H.; SEVER, L.; CANDAN, C.; CANPOLAT, N.; KASAPCOPUR, O.; KURUOGLU, S.; ARISOY, N. Coronary artery calcifications in children with end-stage renal disease. **Pediatric Nephrology**, v. 21, p.1426-1433, 2006.

CLERMONT, G.; LECOUR, S.; LAHET, J.J.; SIOHAN, P.; VERGELY, C.; CHEVET, D.; RIFLE, G.; ROCHETTE, L. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. **Cardiovascular Research**, v.47, p 618-623, 2000.

COFAN, F.; VELA, E.; CLERIES, M.; COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR DYSLIPIDEMIA. Analysis of dyslipidemia in patients on chronic hemodialysis in Catalonia. **Atherosclerosis**, v.184, p 94-102, 2006.

CRISTOL, J.P.; BOSCH, J.Y.; BADIOU, S.; LEBLANC, M.; LORRHO, R.; DESCOMPS, B.; CANAUD, B. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.12, p.2312-2317, 1997.

DAVIES, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals: general aspects. **Journal of Biological Chemistry**, v.262. p.9895-9901, 1987.

DENICOLA, A.; SOUZA, J.M.; GATTI, R.M.; AUGUSTO, O.; RADI, R. Desferrioxamine inhibition of the hydroxyl radical-like reactivity of peroxynitrite: role of the hydroxamic groups. **Free Radical Biology & Medicine**, v.19, p 11-19, 1995.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; WITKO-SARSAT, V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. **Kidney International**, v.59, p.108-113, 2001.

DESCAMPS-LATSCHA, B., DRÜEKE, T.; WITKO-SARSAT, V. Dialysis induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. **Seminars in Dialysis**, v.14, p.193-199, 2001.

DITTRICH, E.; PUTTINGER, H.; SCNEIDER, B.; HÖRL, W.H.; HAAAG-WEBER, M.; VYCHYTIL, A. Is absorption of high-dose oral iron sufficient in peritoneal dialysis patients? **Peritoneal Dialysis International**, v.20, p.667-673, 2000.

DIEPEVEEN, S.H.A.; VERHOEVEN, G.W.H.E.;VAN DER PALEN, J.; DIKKESCHEI, L.D.; VAN TIS, L.J.; KOLSTERS, G.; OFFERMAN, J.J.G.; BILO, H.J.G.; STALENHOF, A.F.H. Effects of atorvastatin and vitamin E on lipoproteins and oxidative stress in dialysis patients: a randomized- controlled trial. **Journal of Internal Medicine**, v.257, p.438-445, 2005.

DIEPEVEEN, S.H.A.; VERHOEVEN, G.W.H.E.;VAN DER PALEN, J.; DIKKESCHEI, L.D.; DIKKESCHEI, B.L.D.; VAN TIS, L.J.; KOLSTERS, G.; OFFERMAN, J.J.G.; BILO, H.J.G.; STALENHOF, A.F.H. The effect of the initiation of renal replacement therapy on lipid profile and oxidative stress during the first 6 months of treatment. **Clinica Chimica Acta**, v.361, p.112-118, 2005.

DRAI, J.; BANNIER, E.; CHAZOT, C.; HUROT, J.M; GOEDERT, G.; JEAN, G.; CHARRA, B.; LAURENT, G.; BALTASSAT, P.; REVOL, A. Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients. **Il Farmaco**, v.56, p.463-465, 2001.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p 47-95, 2002.

DUFFY, S.J.; BIEGELSEN E.S.; HOLBROOK,M.; RUSSELL, J.D.; GOKCE, N.; KEANEY, J.F.; VITA, J.A. Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v.103, p.2799-2804, 2001.

DURAK, I.; AKYOL, Ö.; BASESME, E.; CANBOLAT, O.; KAVUTÇU, M. Reduced erythrocyte defense against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. **Nephron**, v.66, p.76-80, 1994.

DURSUN, B.; KOPARAL, S.; ADANALI, S. Increased risk of premature atherosclerosis at initiation of chronic hemodialysis: a possible link with hypertriglyceridemia? **Dialysis & Transplantation**. p.1 – 6, 2006.

ECE, A.; GÜRKAN, F.; KERVANCIOGLU, M.; KOCAMAZ, H.; GÜNES, A.; ATAMER, Y.; SELEK, S. Oxidative stress, inflammation and early cardiovascular damage in children with chronic renal failure. **Pediatric Nephrology**, v.21, p.545-552, 2006.

ECKARDT, K.U. Pathophysiology of renal anemia. **Clinical Nephrology**, v.53, p.2-8, 2000.

EISELT, J.; RACEK, J.; TREFIL, L.; OPATRNÝ JR, K. Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. **Artificial Organs**, v.25, p.430-436, 2001.

ELZEN, W.P.J.; MANEN, J.G.; BOESCHOTEN, E.W.; KREDIET, R.T.; DEKKER, F.W. The effect of single and repeatedly high concentrations of C-reactive protein on

cardiovascular and non-cardiovascular mortality in patients starting dialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, p.1588-1595, 2006.

ERDOGAN, C.; ÜNLÜÇERÇİ, Y.; TÜRKMEN, A.; KURU, A.; ÇETIN, Ö.; BEKPMAR, S. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. **Clinica Chimica Acta**, v.322, p.157-161, 2002.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.388, p.261-266, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assay of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.114-121, 1984

FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v.180, p.23-32, 2002.

GALETTA, F.; CUPISTI, A.; FRANZONI, F.; CARPI, A.; BARSOTTI, G.; SANTORO, G. Acute effects of hemodialysis on left ventricular function evaluated by tissue Doppler imaging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.60, p.66-70, 2006.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, p.190-195, 2005.

GIRAY, B.; KAN, E.; BALI, M.; HINCAL, F.; BASARAN, N. The effect of vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in hemodialysis patients. **Clinica Chimica Acta**, v.338, p. 91-98, 2003.

GISSI – Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. **The Lancet**, v.354, p.447-455, 1999.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v.10, p.41-47, 1991.

GOTOH, M.; NAGASE, S.; AOYAGI, K.; HIRAYAMA, A.; TAKEMURA, K.; UEDA, A.; TOMIDA, C.; KIKUCHI, H.; KOYAMA, A.; Thiobarbituric acid reactive substances are increased in the subcutaneous fat tissue of patients with end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.12, p.713-717, 1997.

GOUVA, C.; NIKOLOPOULOS, P.; LOANNIDIS, J.P.; SIAMOPOULOS, K.C. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. **Kidney International**, v.66, p.753-760, 2004.

GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods in Enzymology**, v.301, p.58-61, 1999.

GREKAS, D.; ECONOMOU, H.; MAKEDOU, A.; DESTANIS, E.; THEODORIDOU, A.; AVDELIDOU, A.; DEMITRIADIS, A.; TOURKANTONIS, A. Association between hyperhomocysteinemia and ultrasonographic atherosclerotic indices of carotid arteries in chronic hemodialysis patients. **Nephron Clinical Practice**, v.101, p.180-186, 2005.

GROPPER, S.S.; KERR, S.; BARKSDALE, J.M. Non-anemic iron deficiency, oral iron supplementation, and oxidative damage in college-aged females. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.409-415, 2003.

GUTIERREZ, L.L.P.; MAZZOTTI, N.G.; ARAÚJO, A.S.R.; KLIPEL, R.B.; FERNANDES, T.R.G.; LLESUY, S.F.; BELLÓ-KLEIN, A. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.39, p.767-772, 2006.

HALLIWELL, B. Antioxidants: The basis what they are and how to evaluate them. In: SIES, H. **Antioxidants in diseases: Mechanisms and Therapy**. Advances in pharmacology vol.38. Califórnia: Academic Press, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. **Free Radical Biology & Medicine**. 3th ed. Oxford University Press, 1999. 936p.

HANDELMAN, G.J. Current studies on oxidative stress in dialysis. **Blood Purification**, v.21, p.46-50, 2003.

HASE, H.; JOKI, N.; ISHIKAWA, H.; SAIJYO, T.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, Y.; INISHI, Y.; IMAMURA, Y.; NAKAMURA, M.; MOROI, M. Independent risk factors for progression of coronary atherosclerosis in hemodialysis patients. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v.4, p.321-327, 2006.

HIRAYAMA, A.; NAGASE, S.; GOTOH, M.; TAKEMURA, K.; TOMIDA, C.; UEDA, A.; AOYAGI, K.; TERAOKA, J.; KOYAMA, A. Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia. **Nephron**, v.86, p.436-440, 2000.

JANERO, D.R. Malondialdehyde end thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, p.515-540, 1990.

JUREK, A.; TURZYNA, B.; KUBIT, P.; KLEIN A. LDL susceptibility to oxidations and HDL antioxidant capacity in patients with renal failure. **Clinical Biochemistry**, v.39, p.19-27, 2006.

KATO, A.; HAMADA, M.; SUZUKI, T.; MARUYAMA, T.; MARUYAMA, Y.; HISHIDA, A. Effect of weekly or successive iron supplementation on erythropoietin doses in patients receiving hemodialysis. **Nephron**, v.89, p.110-112, 2001.

KAW, D.; MALHOTRA, D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. **Seminars in Dialysis**, v.19, p.317-322, 2006.

KELLY, M.; LACOUR, B.; NGUYEN-KHOA, T. Dysregulation of superoxide dismutase in chronic kidney disease. **Nephron Clinical Practice**, v.100, p.103-104, 2005.

KIECHL, S.; WILLEIT, J.; EGGER, G.; POEWE, W.; OBERHOLLENZER, F. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. **Circulation**, v.96, p.3300-3307, 1997.

KLETZMAYR, J.; HÖRL, W.H. Iron overload and cardiovascular complications in dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.17, p.25-29, 2002

KLIPSTEIN-GROBUSCH, K.; KOSTER, J.F.; GROBBEE, D.E.; LINDEMANS, J.; BOEING, H.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C.M. Serum ferritin and risk myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.1231-1236, 1999.

KOKOT, F.; WIECEK, A.; MESJSUZ, J.; CZAK, A.M.; SPEICHOWICZ, U. Influence of long-term recombinant humanerythropoietin therapy on plasma leptin and neuropeptide Y concentration in haemodialysed uraemic patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.13, p.1200-1205, 1998.

KOOISTRA, M.P.; NIEMANTSVERDRIET, E.C.; MOL-BEERMANN, N.M.; STRUYVENBERG, A.; MARX, J.J. Iron absorption in erythropoietin-treated

haemodialysis patients: effects of iron availability, inflammation and aluminum.

Nephrology Dialysis Transplantation, v.13, p.2578-2582, 1998.

KUMAR, K.V.; DAS, U.N. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? **Free Radical Research Communications**, v.19, p.59-66, 1993.

KUO, P.C.; SCHROEDER, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery**, v.221, p.220-235, 1995.

LACHILI, B.; HININGER, I.; FAURE, H.; ARNAUD, J.; RICHARD, M.J.; FAVIER, A.; ROUSSEL, A.M. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. **Biological Trace Element Research**, v.83, p.103-110, 2001.

LEONARD, S.S.; HARRIS, G.K.; SHI, X. Metal –induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, p.1921-1942, 2004.

LEWIS, N.P.; McDOUGALL, I.C.; WILLIS, N.; HENDERSON, A.H. The ventilatory cost of exercise compared on chronic heart failure renal anemia. **The Quarterly Journal of Medicine**, v.83, p.523-531, 1992.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, p.790-796, 2002.

LIM, P.S.; WEI, Y.H.; YU, Y.L.; KHO, B. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.14, p.2680-2687, 1999.

LIOCHEV, S.I. & FRIDOVICH, I. The role of O₂ in the production of HO: In vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v.16, p.29-33, 1994.

LIOCHEV, S.I. & FRIDOVICH, I. The Haber-Weiss cycle – 70 years later: An alternative view. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v.7, p.55-57, 2002.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; FLECHA, B.S.G.; BOVERIS, A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, p.259-264, 1990.

LLESUY, S.F. Introducción y especies activas de oxígeno. In: MARRONI, N.P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Editora da ULBRA, 2002, p.21 - 32.

LOUGHREY, C.M.; YOUNG, I.S.; LIGHTBODY, J.H.; ME MASTER, D.; ME NAMEE, P.T.; TRIMBLE, E.R. Oxidative stress in hemodialysis. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, v.87, p.679-683, 1994.

LOWE, D.T. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.4, p.441-458, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAHL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUDAT, K.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T.; SIEMS, W.G.; RIEDEL, E.; HAMPL, H. Oxidation parameters in complete correction of renal anemia. **Clinical Nephrology**, v.53, p.30-35, 2000.

MAHER, E.R.; WICKENS, D.G.; GRIFFIN, J.F.A.; KYLE, P.; CURTIS, J.R.; DORMANDY, T.L. Increased free radical activity during haemodialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.2, p.169-171, 1987.

MARKLUND, S. **Handbook of methods for oxygen radical research**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 243 - 247.

MAXWELL, A.J. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. Nitric Oxide: **Biology and Chemistry**, v.6, p.101-124, 2002.

MIMIC-OKA, J.; SAVIC-RADOJEVIC, A.; PLJESA-ERCEGOVAC, M.; OPACIC, M.; SIMIC, T.; DIMKOVIC, N.; SIMIC, D.V. Evaluation of oxidative stress after repeated intravenous iron. **Renal Failure**, v.27, p.345-351, 2005.

MORENO, F.; ARACIL, F.J.; PEREZ, R.; VALDERRABANO, F. Controlled study on the improvement of the quality of life in elderly hemodialysis patients after correcting end-

stage renal disease – renal anemia with erythropoietin. **American Journal of Kidney Disease**, v.27, p.548-556, 1996.

MORIMOTO, H.; NAKAO, K.; KUKUOKA, K.; SARAI, A.; YANO, A.; KIHARA, T.; FUKUDA, S.; WADA, J.; MAKINO, H. Long-term use of vitamin E-coated polysulfone membrane reduces oxidative stress markers in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.20, p.2775-2782, 2005.

MOURAD, A.; CARNEY, S.; GILLIES, A.; JONES, B.; NANRA, R.; TREVILLIAN, P. Acute effect of haemodialysis on arterial stiffness: membrane bioincompatibility? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.19, p.2792-2802, 2004.

NAKAMURA, T.; KAWAGOE, Y.; MATSUDA, T.; TAKAHASHI, Y.; SEKIZUBA, K.; EBIHARA, I.; KOIDE, H. Effects of LDL apheresis and vitamin E – modified membrane on carotid atherosclerosis in hemodialyzed patients with arteriosclerosis obliterans. **Kidney & Blood Pressure Research**, v.26, p.185-191, 2003.

National Kidney Foundation – Dialysis Outcomes Quality Initiative: NKF-DOQI Clinical practice guidelines for the treatment of anemia of chronic renal failure. **American Journal of Kidney Diseases**, v.30, p.192-237, 1997.

NGUYEN-KHOA, T.; MASSY, Z.A.; BANDT, J.P.; KEBEDE, M.; SALAMA, L.; LAMBREY, G.; WITKO-SARSAT, V.; DRÜEKE, T.B.; LACOUR, B.; THÉVENIN, M. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.16, p.335-340, 2001.

NISSENSON, A.R. & FINE, R.N. **Dialysis Therapy** 3 ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2002.

NOHL, H. Nitric oxide end related radicals. **Free Radicals: From Basic Science to Medicine**, G. Poli. E. Albano & M.U. Dianzani (eds), 1993.

PAPAGIANNI, A.; KALOVOULOS, M.; KIRMIZIS, D.; VAINAS, A.; BELECHRI, A.M.; ALEXOPOULOS, E.; MEMMOS, D. Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, p.113-119, 2003.

PAUL, J.L.; SALL, N.D.; SONI, T.; POIGNET, J.L.; LINDENBAUM, A.; MAN, N.K.; MOATTI, N.; RAICHVARG, D. Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. **Nephron**, v.64, p.106-109, 1993.

PEUCHANT, E.; CARBONNEAU, M.A; DUBOURG, L.; THOMAS, M.J.; PERROMAT, A.; VALLOT, C.; CLERC, M. Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E and iron status. **Free Radical Biology & Medicine**, v.16, p.339-346, 1994.

PROTEGGENTE, A.R.; REHMAN, A.; HALLIWELL, B.; RICE-EVANS, C.A. Potential problems of scorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.227, p.535-540, 2000.

REPETTO, M.G.; REIDES, C.G.; CARRETERO, M.L.G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S.F. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v.255, p.107-117, 1996.

REPETTO, M.G.; REIDES, C.G.; EVELSON, P.; KOHANS, S.; LUSTIG, E.S.; LLESUY, S.F. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer. **European Journal of Clinical Investigation**, v.29, p.643-649, 1999.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.233, p.357-363, 1994.

ROOB, J.M.; KHOSCHSORUR, G.; TIRAN, A.; HORINA, J. H.; HOLZER, H.; WINKLHOFER-ROOB, B.M. Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients os hemodialysis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.11, p.539-549, 2000.

ROOYAKKERS, T.M.; STROES, E.S.; KOOISTRA, M.P.; VAN FAASSEN, E.E.; HIDER, R.C.; RABELINK, T.J.; MARX, J.J.M . Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction in vivo. **European Journal of Clinical Investigation**, v.32, p.9-16, 2002.

SALONEN, J.T.; KORPELA, H.; NYSSÖNEM, K.; PORKKALA, E.; TUOMAINEN, T.P.; BELCHER, J.D.; JACOBS, D.R.; SALONEN, R. Lowering of body iron stores by blood letting and oxidation resistance of serum lipoproteins: a randomized cross-over trial in male smokers. **Journal of Internal Medicine**, v.237, p.161-168, 1995.

SARNAK, M.J.; LEVEY, A.S.; SCHOOLWERTH, A.C.; CORESH, J.; CULLETON, B.; HAMM, L.L.; McCULLOUGH, P.A.; KASISKE, B.J.; KELEPOURIS, E.; KLAG, M.J.; PARFREY, P.; PFEFFER, M.; RAIJ, L.; SPINOSA, D.J.; WILSON, P.W. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. **Hypertension**, v.42, p.1050-1065, 2003.

SAS – Institute Statistical Analysis System. **User's guide: version 6.4.** ed. Cary: SAS Institute, 1989. 846p.

SCHETTLER, V.; WIELAND, E.; VERWIEBE, R.; SCHUFF-WERNER, P.; SCHELER, F.; OELLERICH, M. Plasma lipids are not oxidized during hemodialysis. **Nephron**, v.67, p.42-47, 1994.

SEMPOS, C.T.; LOOKER, A.C. Iron status and the risk of coronary heart disease: an example of the use nutritional epimemiology in chronic disease research. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.170-182, 2001.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p.916-921, 1999.

SINDHU, R. K.; EHDAIE, A.; FARMAND, F.; DHALIWAL, K.K.; NGUYEN, T.; ZHAN, C.; ROBERTS, C.K.; VAZIRI, N.D. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1743, p.86-92, 2005.

SOSA, M.A.; BALK, E.M.; LAU, J.; LIANGOS, O.; BALAKRISHNAN, V. S.; MADIAS, N. E.; PEREIRA, B.J.G.; JABER, B.L. A systematic review of the effect of the excebrane dialyser on biomarkers of lipid peroxidation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, p.2825-2833, 2006.

STEPHENS, N.G.; PARSONS, A.; SCHOFIELD, P.M.; KELLY, F.; CHEESEMAN, K.; MITCHINSON, M.J.. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). **The Lancet**, v.346, p.781-786, 1996.

STOCKER, R.; KEANEY, J.F.Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v.84, p.1381-1478, 2004.

STOVES, J.; INGLIS, H.; NEWSTEAD, C.G. A randomized study of oral vs intravenous iron supplementation in patients with progressive renal insufficiency treated with erythropoietin. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.16. p.964-974, 2001.

SULLIVAN, J.L. Iron and the Sex difference in heart disease risk. **The Lancet**, v.1, p. 1293-1294, 1981.

TARNG, D.C.; HUANG, T.P.; LIU, T.Y.; CHEN, H.W.; SUNG, Y.J.; WEI, Y.H. Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. **Kidney International**, v.58, p.790-799, 2000.

THABET, M. A.; CHAN, J.C.M. Vitamin E in renal therapeutic regimens. **Pediatric Nephrology**, v.21, p.1790-1801, 2006.

THOMÉ, S.F.; BARROS, E. Prevenção das Doenças Renais. In. BARROS, E.; MANFRO, R.C.; THOMÉ, F.S.; GONÇALVES, L.F.S. **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. 2. ed. Porto Alegre, Editora Artes Médicas Sul LTDA., 1999, p. 55 - 67.

THOMÉ, S.F.; KAROHL, C.; GONÇALVES, L.F.S. MANFRO, R.C. Métodos Dialíticos. In. BARROS, E.; MANFRO, R.C.; THOMÉ, F.S.; GONÇALVES, L.F.S. **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. 2. ed. Porto Alegre, Editora Artes Médicas Sul LTDA., 1999, p. 441 - 459.

THOMÉ, S.F. Tratamento de ferroprivação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.22, p.17-24, 2000.

TIRANATHANAGUL, K.; EIAM-ONG, S.; TOSOKHOWONG, P.; PRADITPORNsilpa, K.; TUNGSANGA, K. Oxidative stress from rapid versus slow intravenous iron replacement in haemodialysis patients. **Nephrology**, v.9, p.217-222, 2004.

TUOMAINEM, T. P.; PUNNONEM, K.; NYSSÖNEN, K.; SALONEN, J.T. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. **Circulation**, v.97, p.1461-1466, 1998.

UPSTON, J.M.; TERENTIS, A.C.; MORRIS, K.; KEANEY, J.F.; STOCKER, R. Oxidized lipid accumulates in the presence of α – tocoferol in atherosclerosis. **The Biochemical Journal**, v.363, p.753-760, 2002.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medical Chemistry**, v.12, p.1161-1208, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MANSUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VOEGELL, R.; MELER, J.; RIES, R. Defesa contra espécies reativas de oxigênio – modelos “in vitro”. **Cosmetics & Toiletries**, v.4, p.49-55, 1992.

WANNER, C. Importance of hyperlipidaemia ant therapy in renal patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.15, p.92-96, 2000.

WEINSTEIN, T.; CHAGNAC, A.; KORZETS, A.; BOAZ, M.; ORI, Y.; HERMAN, M.; MALACHI, T.; GAFTER, U. Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.15, p.883-887, 2000.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L.T. Anemia of chronic disease. **New England Journal of Medicine**, v.352, p.1011-1023, 2005.

WITKO-SARSAT, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation proteins products: novel uraemic toxins and pro-inflammatory mediators in chronic renal failure? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.12, p.1310-1312, 1997

WRATTEN, M.L.; TETTA, C.; URSINI, F.; SEVANIAN, A. Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. **Kidney International**, v.58, p.126-132, 2000.

XUE, J.L.; MA, J.Z.; LOUIS, T.A.; COLLINS, A.J. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.16, p.1164-1165, 2005.

YU, P.B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-162, 1994.

YUSUF, S.; DAGENAIS, G.; POGUE, J.; BOSCH, J.; SLEIGHT, P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart outcomes

Prevention Evaluation Study (HOPE). **New England Journal of Medicine**, v.342, p.154-160, 2000.

ZWOLINSKA, D.; GRZESZCZAK, W.; KILLIS-PSTRUSINSKA, K.; SZPRYNGER, K.; SZCZEPANSKA, M. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children with chronic renal failure. **Pediatric Nephrology**, v.19, p.888-892, 2004.

ZWOLINSKA, D.; GRZESZCZAK, W.; SZCZEPANSKA, M.; KILLIS-PSTRUSINSKA, K.; SZPRYNGER, K.. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis. **Pediatric Nephrology**, v.21, p.705-710, 2006.

8. ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão Científica e pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 03-260

Versão do Projeto: 10/07/2003

Versão do TCLE: 14/07/2003

Pesquisadores:

MARIA CLAUDIA IRIGOYEN

ADRIANE BELLO-KLEIN

FERNANDO SALDANHA THOME

PATRICIA DALL'AGNOL BIANCHI

Título: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE FERRO PARA TRATAMENTO DA ANEMIA RENAL NO ESTRESSE OXIDATIVO E FUNÇÃO ENDOTELIAL DE PACIENTES QUE REALIZAM HEMODIÁLISE

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 14 de julho de 2003.


Profa. Themis Reverbel da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Sr.(a) está sendo convidado a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar o efeito do tratamento da anemia renal com ferro na produção de radicais livres e defesas do organismo contra os mesmos. Os radicais livres são normalmente produzidos em nosso organismo porém, em algumas situações, podem estar aumentados podendo causar dano às células. Para este estudo, serão realizadas algumas avaliações que consistirão em coletas de sangue antes da hemodiálise, logo após a hemodiálise e 24 horas após a hemodiálise. Estas avaliações serão realizadas em seis momentos distintos. A primeira avaliação será em uma sessão em que o Sr.(a) não receberá dose de ferro. A segunda avaliação será em uma sessão onde o Sr.(a) receberá ferro., Antes da terceira avaliação (15 dias após a segunda avaliação), o senhor receberá uma dose de Vitamina E, com capacidade de combater radicais livres sem fazer mal a sua saúde. Nesta avaliação o Sr.(a) também receberá dose de ferro que é normalmente administrada. A partir da terceira avaliação a Vitamina E deverá ser tomada diariamente e, após trinta dias de uso do antioxidante- Vitamina E, uma nova avaliação será realizada em uma sessão em que o Sr.(a) receberá ferro. O uso da vitamina E deverá ser feito por mais cinco meses, onde nova avaliação será realizada, primeiramente em uma sessão de hemodiálise sem o recebimento de ferro e, posteriormente, em uma sessão com ferro.

Não haverá despesas pessoais para o Sr.(a) em qualquer fase desta pesquisa, incluindo os exames e a Vitamina E. Também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação.

Os dados coletados serão utilizados somente para pesquisa. Todos os resultados dos exames serão guardados sob nosso sigilo, resguardando seu anonimato.

Esses exames auxiliarão os profissionais que trabalham com pacientes em hemodiálise a entender melhor os efeitos do ferro e sua relação com os radicais livres e também os benefícios do tratamento com Vitamina E.

Eu..... concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

..... Data...../...../.....
Assinatura do voluntário/representante legal

..... Data...../...../.....
Assinatura do responsável pelo estudo

9. APÊNDICES

APÊNDICE A: Artigo submetido para avaliação no periódico Nephron.

Time Course Profile of Peripheral Markers of Oxidative Stress in Chronic Renal Failure

Short Title: **Peripheral Markers of Oxidative Stress in Hemodialysis**

Patrícia Dall'Agnol Bianchi¹; Jaqueline Barp¹; Maria Cláudia Irigoyen¹; Adriane
Belló-Klein ¹

*¹Departamento Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Brasil*

Corresponding author: Dr. Adriane Belló-Klein

Sarmento Leite, 500.

CEP: 90050-170 - Porto Alegre - RS - Brasil

Email: belklein@ufrgs.br

Telephone: 552151 33083621 Fax: 552151 33083166

Abstract

Background: Chronic renal failure is accompanied by a complex of pathologies which may be associated to hyperproduction of free radicals. This study aimed to evaluate the effect of iron supplementation, and the effect of vitamin E in the oxidative stress in patients under hemodialysis.

Methods: In the plasma, carbonyls, nitrite and nitrate levels were evaluated, and in the erythrocytes, lipoperoxidation and antioxidant enzyme activities, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. The first evaluated the effects of hemodialysis (HD). The subsequent session evaluated the effects of iron hydroxide saccharate III dosis (100 mg). Vitamin E effects (400 mg and 800 mg) were evaluated in the following sessions.

Results: A single session HD does not change the reality. Supplementation with iron does not modify the oxidative levels of damage to lipids and proteins observed in these patients. Oral administration of vitamin E is an efficient option to reduce oxidative stress in hemodialysis patients. Vitamin E significantly reduced the oxidation of lipids and proteins and the use of 800 mg/day during thirty days was more effective.

Conclusions: Vitamin E addition should be encouraged to prevent oxidative stress deleterious effects in end-stage renal patients.

Keywords: Hemodialysis. Iron Supplementation. Lipidperoxidation. Oxidative Stress. Vitamin E.

Introduction

Chronic renal failure is accompanied by a complex pathology. Some manifestations such as accelerated aging, cataract, atherosclerosis, impaired red blood cell (RBC), increased hemolysis and platelet dysfunction are associated with this disease, and these pathologies may be related to the hyperproduction of free radicals¹. Atherosclerotic cardiovascular diseases are considered the main cause of morbidity and mortality in uremic patients. The development of accelerated atherosclerosis involves multiple risk factors. Some are similar to those reported for the population in general, such as aging, smoking abuse, diabetes, hypertension and dyslipidemia. Other factors, more specific, are associated with nephrons loss and induce metabolic disturbs like hyperfibrinogenemia, hyperhomocysteinemia and oxidative stress².

The pathophysiology of cardiovascular events in uremia is multifactorial, but accelerated atherosclerosis seems to have a central role in the cardiovascular dysfunction and it is plausible that oxidative stress contributes to the high prevalence of these diseases. Thus, oxidative stress involvement has been used to formulate hypothesis that aims to explain the high incidence of these cardiovascular diseases in chronic renal patients³.

Anemia is one of the complications of greater impact in the uremic patients quality of life and seems to be an important aggravation factor in chronic renal disease patients⁴. The use of erythropoietin as a resource for anemia treatment in hemodialysis (HD) patients has been considered one of the most important advances. Iron supplementation improves erythropoietin, resulting in a reduction of the required human recombinant erythropoietin dosis⁵. Thus, iron supplementation is almost considered mandatory to hinder anemia resulting from chronic hemodialysis in renal patients treated with erythropoietin⁶. Iron is involved in the process as a catalyst in the generation of reactive oxygen species (ROS), like the toxic hydroxyl radical, and ferrous species may be involved in different lipidperoxidation (LPO). Increase in iron levels results in exacerbated free radicals production, and this contributes to accelerate the atherosclerotic platelet formation process⁷.

The hypothesis that lipoperoxidation performs an important role in atherosclerosis pathogenesis has aroused an increasing enthusiasm on the use of antioxidants as antiatherogenic agents. Aiming to hinder the increase of oxidative stress in these patientes, several studies using vitamin E therapy have been published. Cristol et al. (1997) observed that the malonaldehyde (MDA) values, a LPO marker, in chronic hemodialysis renal patients were higher than those found in control patients, and that this increase was independent of

erythropoietin administration. After oral administration of supplemental vitamin E (500mg/day), a progressive reduction in the MDA concentrations was registered in these patients, as well as an increase in vitamin E in the erythrocytes. Moreover, studies using a type of modified hemodialysis membrane with vitamin E have been carried out trying to hinder the oxidative stress shown by these patients^{8,9,10}.

However, not all studies have demonstrated beneficial effects with the use of vitamin E. A study carried out by Diepeveen et al., (2005), aimed to evaluate the effects of the treatment with atorvastatin, alpha-tocopherol and a combination of both, in the lipoproteins and oxidative stress in HD patients. Atorvastatin treatment was effective in reducing total cholesterol, triglycerides, LDL, and oxidated LDL, but additional vitamin E supplementation did not show any effect in the lipid profile and oxidative stress.

Renal disease patients receive iron supplementation to treat renal anemia and it may potentialize ROS production contributing to increase the oxidative stress of these patients. The administration of a classical antioxidant like vitamin E could prevent these alterations.

This study aimed to evaluate the repercussion of a hemodialysis session on peripheral markers of oxidative stress in chronic renal patients, the oxidative stress profile in view of iron supplementation to treat renal anemia and, in addition, to evaluate the effect of different dosis of vitamin E supplementation.

Subjects and methods

Study population: Twenty-one patients, 7 females and 14 males were evaluated. The mean age was 53.76 (± 17.12) years. All patients were undergoing hemodialysis three times a week and the mean duration time of the dialysis was 4.18 (± 0.32) hours. The patients had been in hemodialytic treatment for 41 (± 40) months. All of them used a modified cellulose dialysis membrane (cellulose acetate). Exclusion criteria were: hepatic diseases; known cardiac disease; smoking habit; and alcohol abuse. The main characteristics of hemodialysis patients are presented in Table 1. The control group was composed of 18 individuals without history of renal or hematologic disease (14 males and 4 females). The mean age was 34.77 ± 10.09 years, all blood donors of the Blood Bank of the Clinical Hospital, in Porto Alegre, Brazil. This study was evaluated in its ethical and methodological aspects, and the patients were evaluated only after signing a free and clear agreement term.

2 Experimental Protocols

Evaluation 1 – Repercussion of single a HD session on the oxidative stress of chronic renal disease patients.

This evaluation aimed to evaluate the effect of an hemodialysis session on the systemic oxidative stress. Four blood sample collections were done: before HD (Pre HD); soon after patients being connected to the dialysing machines; immediately after HD (Post HD), when patients were disconnected from the dialysing machines; 24 hours after the beginning of HD (Post HD 24h); in the interdialytic day, and 48 hours later (Post HD 48h), when the patients were again connected to a dialysing machine for a second HD.

Evaluation 2 – Iron supplementation to treat renal anemia on the oxidative stress of chronic renal disease patients.

In this evaluation a blood sample was collected at the beginning of the session and another twenty-four hours after HD. The administration of 100 mg of iron (iron III hydroxide saccharate) diluted in 50 ml of saline solution) was applied at fifteen-day intervals, intravenously, in the last thirty minutes of the HD session. Iron effects were determined in a session where patients received only iron supplementation.

Evaluation 3 – Acute and chronic vitamin E supplementation effect.

Vitamin E supplementation was orally administrated through the use of gelatinous capsules containing 400 mg tocopherol acetate (vitamin E). Acute treatment: the first session evaluated the effects of vitamin E associated with iron, six to eight hours before HD, and the patients received orally 800 mg of tocopherol acetate (800 mg/ 6 to 9 hours before HD). Chronic treatment: after the evaluation of the chronic treatment these patients continued to receive 400 mg of tocopherol acetate daily for a thirty-day period (400mg/day/30days) in one of their main meals. After thirty days, a new HD session, when the patients received iron, was evaluated. Later, vitamin E dosis was doubled, and the patients received 800 mg/day. Thirty days after this new dosis supplementation (800mg/day/30days), the patients were again evaluated in a session when they received a new iron dosis.

Blood sample collection: The collected blood was stored in a vaccum collecting tube containing EDTA anticoagulating (4 mL), to perform the hemogram and iron metabolism measurements; a collecting vaccum tube without additive (4 mL), for biochemical analysis; and a third vaccum collecting tube containing heparin anticoagulant (10 mL), were used to

study the oxidative stress. Blood preparation to evaluate the oxidative stress was unfailingly performed at the collecting day. After collection, blood was centrifuged for 20 minutes at 3000 rpm in refrigerated centrifuge (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), plasma was separated, aliquoted 2.0 mL Eppendorff tubes and stored at –80 C. Plasma was used to evaluate protein oxidation through the carbonyl method, and also for the determination of nitrites and nitrates. Erythrocytes were washed with saline solution (NaCl 0.9%), and an amount of erythrocytes was placed in an Eppendorff tube where the same quantity of physiologic serum was added, being then centrifuged at 3000 rpm for five minutes. At the end of the centrifugation the supernatant was discarded. The procedure was repeated three times. White cells were discarded by aspiration and the erythrocytes diluted 1/10 in 1mM acetic acid and 4mM magnesium sulfate. The erythrocytes were used to measure lipidperoxidation for chemiluminescence, hemoglobin concentration and activity of antioxidant enzymes.

Carbonyl assay: Plasma samples were incubated with 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH 10 mmol/L) in 2.5 mol/L HCl solution for 1h at room temperature, in the dark. Samples were vortexed every 15 min. Then, 20% TCA (w/v) solution was added in tube samples, left in ice for 10 min and centrifuged for 5 min at 1000g, to collect protein precipitates. Another wash was performed with 10% TCA. The pellet was washed 3 times with ethanol acetate (1:1) (v/v). The final precipitates were dissolved in 6 mol/L guanadine hydrochloride solution, left for 10 min at 37C, and read at 360 nm¹². The results were expressed as nmol/mg prot.

Nitrate Level: Serum nitrate was estimated by Griess reaction according to the procedure of Granger et al. (1999). Plasma samples (50 µL) were incubated with enzymatic co-factors and nitrate reductase, so that the nitrate can be reduced to nitrite. Griess reagent (1g sulfanilamide, 0.1g naphthylene, and 2.3 mL of 85% phosphoric acid) was added. Absorbance was read at 540nm in spectrophotometer. Standard curves were prepared with 1mmol/L sodium nitrate, and results expressed as µM of nitrate.

Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence: Chemiluminescence (CL) was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB – Produkter AB, Sweden). Erythrocyte samples were placed in vials reaction medium consisting of 140 mmol/L KCl, 20 mmol/L phosphate buffer (pH=7.4). Measurements were started by the addition of 3 mmol/L tert-butyl

hydroperoxide and data expressed as counts per second per milligram of protein of the homogenates (cps/mg protein)¹⁴.

Measurement of antioxidant enzyme activities in erythrocytes: SOD activity, expressed as units per milligram of protein, was based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol¹⁵. CAT activity was determined by following the decrease in 240-nm absorption of hydrogen peroxide (H₂O₂). It was expressed as nanomols of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein¹⁶. GPx activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm as described by Flohé and Gunzler (1984). GPx results were expressed as nanomols of peroxide/hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein. Protein concentration was measured by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis: Data are presented as mean \pm SEM. Data obtained were submitted to one way variance analysis (ANOVA). When significant mean values were compared using the Duncan test. For the statistical analysis of data obtained from healthy controls versus data obtained from HD patients, the Student t test was used. Values of P <0.05 were considered significant.

Results

Evaluation 1 – Repercussion of a single HD session on the oxidative stress of chronic renal disease patients.

When values that represent nitrite levels (μ M) in the patients' plasma are analysed, it is possible to observe that they presented a significant variation all through the evaluation ($p < 0.003$). A significant increase occurred immediately after HD, (Pre HD 0.049 ± 0.008) and (Post HD 0.172 ± 0.04), and that this increase remained for a 24h-period (Post HD 24h 0.153 ± 0.03). Forty-eight hours after HD (Post HD 48h 0.059 ± 0.008) there was a reduction in these levels which again reached the values observed in Pre HD (Figure1). GPx enzyme activity (μ moles/min/mg prot) ($p = 0.025$), was significantly reduced immediately after HD (Post HD 4.4 ± 0.46), and this reduction remained for a 24h-period (Post HD 24h 4.1 ± 0.40); after this period, its activity showed to again reach those values registered at the beginning of the HD session (5.4 ± 0.35). SOD enzyme activity (U/mg prot) also showed significant variation all through the evaluation ($p < 0.0001$). SOD showed an increase in its activity at the end of the HD (Post HD 4.4 ± 0.46), when compared to the values obtained Pre HD (Pre HD

2.1±0.44), and the values remained high for a 48h-period (Post HD 48h 2.9±0,26) (Figure 1). Even though there was significant variation in the activity of SOD and GPx, and in nitrite levels, there was no significant variation in LPO (p=0.48) levels as well as in carbonyl (p=0.62) levels, nitrate levels (p=0,68), and activity of the CAT enzyme (0,16). When LPO by CL of CS was compared with values obtained from chronic renal failure patients before HD, values were significantly higher, and carbonyl levels followed the same pattern (Table 2). Nitrate levels and SOD enzyme activity in chronic renal patients showed a significant reduction when compared to CS, however, nitrite levels and CAT activity enzyme were not significantly different (Table 2).

Evaluation 2 – Iron supplementation to treat renal anemia on the oxidative stress of chronic renal patients.

Table 3 shows the values obtained before and after one HD session when the patients received an intravenous dosis of a 100mg of iron hydroxyde saccharate III at the last 30 minutes of the HD session. It is possible to observe that there was no significant variation in LPO (p=0.86) levels and in carbonyl (p=0.51) levels. The activity of the antioxidant enzymes SOD (p=0.15), CAT (p=0.43) and GPx (p=0.15), as well as nitrite (p=0.07) and nitrates (p=0.63), also did not show any significant variation.

Evaluation 3 – Acute and chronic vitamin E supplementation effect.

Data show that the dosis used, independently of being acute or chronic, determined reductions in patients' LPO (CL) levels (p<0.0001) (Table 4). Any difference was observed when a single 800 mg vitamin E dosis was compared with chronic administration of 400 mg/day/30days. The most important response was observed when the effects of 800 mg/day/30days chronic administration were evaluated, LPO levels were the lowest observed throughout this study. When patients used Vitamin E, a reduction in LPO levels was observed, and this reduction was so important that in the HD sessions when 400 mg/day/30days vitamin E was administered (Pre 400 mg/day/30days), values were similar to those observed in CS. When LPO levels were observed before one HD session with previous acute administration of 800 mg Vitamin E (Pre HD 800 mg single dosis) or chronic administration (Pre HD 800 mg/day/30days), LPO levels were still smaller, being statistically inferior to those observed in CS (p<0,05). Thus, as it occurred with LPO, there was a reduction in carbonyl levels when patients received Vitamin E supplementation (p<0.0001).

When carbonyl levels were compared it was observed, in all evaluations, that the registered values in chronic renal failure patients were higher than in the CS ($p < 0,05$). When results of different Vitamin E supplementation ways were compared, it was verified that the 800 mg/day/30days treatment was more efficient in reducing protein oxidation levels. SOD ($p=0.0005$) and GPx (0.014) antioxidant enzymes showed significant variation throughout this study when evaluated before HD sessions. SOD presented an increase in its activity before the HD sessions when acute administrations of 800 mg Vitamin E were performed, and also before HD when patients had received 400 mg/day/30days. Nitrate levels observed after chronic administration of vitamin E were significantly higher than those observed without vitamin E ($p=0.0003$). The activity of CAT enzyme ($p=0,12$), and nitrite levels ($p=0,19$), did not show any significant variation during this study.

Discussion

Peripheral markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma evaluated through techniques that use chemiluminescence (CL) as a tool are preferable, since these techniques are more sensible and rapid and allow to evaluate and quantify reactive oxygen species (ROS) in the sample. They are minimally invasive markers, since they require only small quantities of the patients' biological fluid^{19,20}.

Lipidperoxidation (LPO) has been demonstrated to be involved in the pathogenesis of diseases like atherosclerosis and cancer, common diseases found in chronic renal failure patients in HD. Increased levels of ROS to the thiobarbituric acid (TBARS) have been reported in these patients, but it is not clear if LPO is cause or consequence of the pathology itself. It can not be excluded the possibility of LPO increase as a result of the hemodialytic treatment, since it is possible that granulocytes may be activated by dialysis membranes, resulting in ROS generation. Besides, blood is exposed to a great flow and to artificial surfaces during the extracorporeal circuit. TBARS may also be formed during peroxidation of the arachidonic acid by the enzymes lipoxygenase and cyclooxygenase²¹. A preconized theory is that LPO occurs during dialysis due to the activation of inflammatory cells caused by bioincompatibility of dialysis membranes. This would lead to the activation of lipopolysaccharides or inflammatory cytokines^{22, 23}. Moreover, oxidative stress can also occur as a consequence of the great flow to which blood is submitted during a dialysis session²¹.

Quite a number of studies evaluated lipoperoxidation through TBARS technique. Free radicals attack polyunsaturated fatty acids of cellular membranes resulting in the formation LPO products such conjugated dienes MDA, one of the components measured by TBARS. TBARS is a well known method, but not sensible and specific enough. It is known that many factors, such as fatty acids composition, quantity of fat and antioxidants, can modify this reaction²⁴. During HD, there occurs influence of several substances, including glucose, that may affect the reaction with TBA. Thus, the use of a more sensible technique to improve quality and accuracy of lipoperoxidation determinations in chronic renal patients is necessary^{26, 22}. In this work, lipoperoxidation determination used the chemiluminescence technique (CL), as described by Gonzalez-Flecha et al., (1991), taking into account that it is a simple, reliable and sensible method to measure LPO.

Data show that CL values were not modified by the HD session and that they remained the same for a 48h-period. It is believed that a pathway shared by both, hemodialysis and uremia, since the oxidative stress increase has been described in all renal disease stages, is the amplification of inflammatory answers. An initial starting stimulus could provoke the production of inflammatory cytokines, like superoxide and hydrogen peroxide. Associated to this, the lack of antioxidants defense, to close or diminish this amplified answer, could lead to a vicious and chronic free radicals cycle causing the production of inflammatory mediators that once again would come to stimulate these cycles. This chronic production may damage proteins, membrane lipids and DNA, keeping high the oxidative stress in these patients²³.

It was observed in this study that there was no significant alteration in carbonyl levels after a HD session and that these values did not change during a 48h-period, thus reproducing the lipoperoxidation observed pattern. Protein oxidation has also been suggested as important oxidative stress index²⁷. This study indicates that the oxidative protein measurements may have some advantages when compared with lipidperoxidation products due to its relatively precocious formation and the relative stability of these compounds²⁸. The attack of ROS to proteins may lead to functional alterations, particularly the progressive loss of their metabolic, enzymatic and immunological properties. Carbonyls formation involve cations of the redox cycle like iron and copper, which have linking sites in proteins and may transform aminoacids residues in carbonyls in the presence of hydrogen peroxide and superoxide anion²⁷. Thus, a HD session did not have any repercussion in the increase of oxidative damage levels to lipids and proteins in chronic renal failure patients.

When values referring to nitrite levels in plasma of evaluated individuals are observed, a significant increase immediately after HD is registered, and remained high for 24 hours after HD. However, when nitrite levels were evaluated 48 hours after HD, it was observed that they reached the levels registered at the beginning of the evaluation, that is, before the HD session. When patients are submitted to HD session, a NO increase may be induced due to blood flow increase and shear stress to which blood is submitted during this procedure. The circulating peroxyde may react with NO causing its inactivation and forming nitrates, or peroxynitrite (ONOO), that is a highly toxic product. Peroxynitrite spontaneous decline may lead to the nitrite and hydroxyl radical formation²⁹. The mechanism may explain the significant increase in nitrite levels observed in renal disease patients after hemodialysis session.

Despite the nitrite levels increase after HD session, lipidperoxidation and carbonyls levels increase were not observed after the procedure. This could have been controlled by the antioxidant system, mainly by the superoxide dismutase enzyme, that had a significant increase in its activity after HD session. SOD activity increase had its peak immediately after HD session, but its activity remained increased for 48 hours after the procedure, when the intensity of this activity had already reached values near to those found before HD.

Anemia is present in the great majority of chronic renal failure patients and is one of the most impacting complications in the quality of life of these patients. An excellent anemia treatment usually requires erythropoietin therapy, improving quality of life in end-stage renal patients. Iron functional deficiency clearly limits erythropoietin capacity in supporting erythropoiesis, and thus iron supplementation has a cost-benefice associated to the reduction of the required erythropoietin dosis. However, parenteral iron use may produce iron overload and potentialize oxidative stress, increasing risk of cardiovascular disease³⁰.

Iron direct effects on the endothelium and the proliferative effect on smooth cells, or damage on the endothelial cells through low density lipoproteins oxidation have been frequently suggested as intricated atherosclerosis mechanisms to iron effects⁷.

Serun ferritin has been associated to increased cholesterol levels, products that promote atherosclerosis coronary arterial disease. An association between iron overload and acute myocardial infarct ion was also shown. It is important to carefully analyze the link between ferritin high levels and atherosclerosis. Ferritin levels can increase due to inflammation and can be associated with atherosclerosis³¹.

A study carried out by Rooyackers et al., (2002) demonstrated that the infusion of 100 mg of iron in healthy volunteers was associated with superoxide generation in the blood,

accompanied by a significant reduction in the vasodilatation flow mediated. The increase in protein oxidation products correlated with iron exposition and with the intimate layer of hemodialysis patients³³. It was also observed an oxidative burst in hemodialysis patients with ferritin levels higher than $650\mu\text{g L}^{-1}$ ³⁴. Even though studies indicate a relation between ferritin levels and oxidation, in this study it was observed that supplementation with 100mg of Iron Hydroxyde Saccharate III at the end of the HD session did not represent oxidative stress increase. Also, this study did not observe any relation between ferritin levels and transferrin with the levels of oxidative damage to lipids and proteins of the evaluated patients. The transferrin system promotes a reduction of the free circulating iron in the blood stream that may permit to the body an effective detoxification of a free iron fraction of the formulation used for supplementation. In the blood system of adults, the apotransferrin may detoxifycate around 6mg of free iron. An intravenous iron dosis of 500mg contains about 10mg of free iron, exceeding transferrin capacity in 4 mg. This amount of free iron may come to increase infections in a transitory way, as well as the oxidative stress levels³⁵. However, for the iron dosis used in this research, this detoxification capacity showed to be more than sufficient.

Data obtained in this study show that the oxidative damage levels are significantly increased when compared to healthy controls and this may be explained in part by the reduction of some antioxidant enzyme activity, mainly superoxide dismutase.

The inflammatory process induces ROS production, leading to soluble antioxidants consumption and later to LDL and LPO. The inflammatory process observed in the patients of this study, through the high reactive protein C levels, and the oxidative stress observed through CL and carbonyls, is going to act synergically in a vicious cycle, eventually leading to accelerated atherosclerosis².

There exists a paradox among the dramatic answers with vitamin E supplementation in studies carried out with animals and the lack of proved efficacy in some studies with human beings. One of the related possibilities is the great number of variables, such as the nature and dosis of vitamin E, therapy duration, disease stage, age of patients and renal insufficiency degree, among other factors³⁶.

Data showed in this study clearly demonstrate that orally administrated vitamin E is an efficient option to reduce oxidative stress in hemodialysis patients. Vitamin E used in a chronic and acute way, in the dosis of 800mg/day, reduced lipidperoxidation levels to levels lower than those observed in healthy controls and the lowest peroxidation levels were observed after the continuous use of this dosis for a thirty-day period. Thus vitamin E had a

positive action on renal patients submitted to the vitamin E administration protocol used in this research.

Conclusion

Chronic renal failure patients under hemodialytic treatment show high oxidative levels, but these are not exacerbated by the treatment. A single HD session does not interfere in the observed EO levels. Supplementation with 100mg of iron to treat renal anemia did not show any repercussion in increasing oxidative damage to lipids and proteins in chronic renal patients, showing to be a safe procedure.

Vitamin E treatment was effective to reduce oxidative stress levels of these patients, and the higher dosis used, 800mg/day/30days, significantly reduced the oxidative damage levels to lipids and proteins.

Thus, vitamin E addition, due to its antioxidant capacity, should be encouraged to prevent the deleterious effects of the oxidative stress observed in end-stage renal patients.

Acknowledgements

CNPq and FAPERGS, Brazilian Research Agencies supported this study.

References

1. Paul, J.L.; Sall, N.D.; Soni, T.; *et al.* Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. *Nephron* 1993; 64:106-109.
2. Nguyen-khoa, T.; Massy, Z.A.; Bandt, *et al.* Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 335-340.
3. Clermont, G.; Lecour, S.; Lahet, J.J.; *et al.* Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 618 – 623.
4. Gouva, C.; Nikolopoulos, P.; Loannidis, J.P.; *et al.* Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney Int* 2004; 66: 753-760.
5. Lim, P.S.; Wei, Y.H.; Yu, Y.L.; *et al.* Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2680-2687.
6. Cristol, J.P.; Bosc, J.Y.; Badiou, S.; *et al.* Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2312-2317.
7. Minquin, r.; Watt, F.; Huat, B.T.; *et al.* Correlation of iron and zinc levels with lesion depth in newly formed atherosclerotic lesions. *Free Rad Biol Med* 2003; 37: 746 – 752.
8. Sosa, M.A.; Balk, E.M.; Lau, J.; *et al.* A systematic review of the effect of the excebrane dialyser on biomarkers of lipid peroxidation. *Nephrol Dial Transplan* 2006; 21: 2825-2833.
9. Morimoto, H.; Nakao, K.; Kukuoka, K.; *et al.* Long-term use of vitamin E-coated polysulfone membrane reduces oxidative stress markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplan* 2005; 20: 2775-2782.

10. Eiselt, J.; Racek, J.; Trefil, L.; *et al.* Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. *Artificial Organs* 2001; 25: 430-436.
11. Diepeveen, S.H.A.; Verhoeven, G.W.H.E.; Van Der Palen, J.; *et al.* The effect of the initiation of renal replacement therapy on lipid profile and oxidative stress during the first 6 months of treatment. *Clin Chimica Acta* 2005; 361:112-118.
12. Reznick, A.Z.; Packer, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymol* 1994; 233: 357-363.
13. Granger, D.L.; Anstey, N.M.; Miller, W.C.; *et al.* Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymol* 1999; 301: 58-61.
14. Gonzalez Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. 15. *Free Rad Biol Med* 1991; 10: 41-47.
15. Marklund, S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press 1985; 243 - 247.
16. Aebi Catalase in vitro. *Methods in Enzymol* 1984;105:121-126.
17. Flohé, L.; Gunzler, W.A. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymol* 1984;105: 114-121.
18. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-275.
19. Repetto, M.G.; Reides, C.G.; Evelson, P.; *et al.* Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 643-649.
20. Gutierrez, L.L.P.; Mazzotti, N.G.; Araújo, A.S.R.; *et al.* Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 767-772.
21. Schettler, V.; Wieland, E.; Verwiebe, R.; *et al.* Plasma lipids are not oxidized during hemodialysis. *Nephron* 1994; 67: 42-47.
22. Maher, E.R.; Wickens, D.G.; Griffin, J.F.A.; *et al.* Increased free radical activity during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplan* 1987; 2: 169-171.
23. Wratten, M.L.; Tetta, C.; Ursini, F.; *et al.* Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. *Kidney Int* 2000; 58: 126-132.
24. Janero, D.R. Malondialdehyde end thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad Biol Med* 1990; 9: 515-540.
25. Hirayama, A.; Nagase, S.; Gotoh, M.; *et al.* Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia. *Nephron* 2000; 86: 436-440.
26. Gonzalez Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991; 10: 41-47.
27. Descamps-Latscha, B., Drüeke, T.; Witko-Sarsat, V. Dialysis induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial* 2001; 14: 193-199.
28. Erdogan, C.; Ünlüçerçi, Y.; Türkmen, A.; *et al.* The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clin Chimica Acta* 2002; 322:157-161.
29. Denicola, A.; Souza, J.M.; Gatti, R.M.; *et al.* Desferrioxamine inhibition of the hydroxyl radical-like reactivity of peroxynitrite: role of the hydroxamic groups. *Free Rad Biol Med* 1995; 19:11-19.
30. Besarab, A. Iron and cardiac disease in the end-stage renal disease setting. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 18-24.
31. Sengölge, G.; Hörl, W.H.; Sunder-Plassmann, G. Intravenous iron Therapy: Well-tolerated, yet not harmless. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 46 – 51.

32. Rooyackers, T.M.; Stroes, E.S.; Kooistra, M.P.; *et al.* Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction in vivo. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 9-16.
33. Drüeke, T.; Witko-Sarsat, V.; Massy, Z.; *et al.* Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 2002; 106: 2212 – 2217.
34. Patruta, S.I.; Edlinger, R.; Sunder-Plassmann, G. *et al.* Neutrophil impairment associated with iron therapy in hemodialysis patients with functional iron deficiency. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 655 – 663.
35. Handelman, G.J. Current studies on oxidative stress in dialysis. *Blood Purif* 2003; 21: 46-50.
36. Thabet, M. A.; Chan, J.C.M. Vitamin E in renal therapeutic regimens. *Pediatr Nephrol* 2006; 21:1790-1801.

Table 1: Main characteristics of hemodialysis patients.

Gender (males/females)	14/7
Hematocrit (%)	34.1 ± 1.12
Hemoglobin (g/dL)	11.0 ± 0.38
Total Cholesterol (mg/dL)	178 ±12.62
LDL Cholesterol (mg/dL)	107 ±17.60
HDL Cholesterol (mg/dL)	36 ± 2.41
Transferrin (mg/dL)	164 ± 5.89
Ferritin (ng/mL)	555.40 ± 283

Results are expressed as means ± ESD.

Table 2: Oxidative profile in HD x Healthy Controls.

	Healthy Controls	Pre HD
Chemiluminescence (CL) (cps/mg Hb)	13141 ± 450	17144 ± 772 *
Carbonyls (nmol/mg prot)	3.3 ± 0.25	11.6 ± 0.66 *
CAT (Pmoles/mg prot)	7.94 ± 0.26	7.30 ± 0.77 ^{ns}
SOD (U/mg prot)	7.22 ± 0.26	3.12 ± 0.26 *
Nitrites (µM)	0.052 ± 0.005	0.049 ± 0.008 ^{ns}
Nitrates (µM)	4.35 ± 0.36	1.74 ± 0.36 *

^{ns} and * indicate, respectively, similarity and treatments difference in comparison to the control (CS) when the t Test 5% probability error (p<0,05) was applied. Results are expressed as means ± ESD.

Table 3: Evaluation 2 – Effect of iron supplementation in chronic renal failure patients.

	Pre HD Iron	Post HD Iron 24h	F Prob treatment
Urea (mg/dL)	177 (\pm 8.28) a	126 (\pm 8.42) b	<0.0001*
Uric Acid (mg/dL)	5.6 (\pm 0.26) a	4.6 (\pm 0.17) b	<0.0001*
Chemiluminescence (CL)(cps/mg Hb)	17144 (\pm 772)	19718(\pm 2029)	0.86
Carbonyls (nmol/mg prot)	11.59 (\pm 0.66)	12.20 (\pm 0.54)	0.51
CAT (pmoles/mg prot)	7.3 (\pm 0.77)	8.0 (\pm 0.82)	0.43
SOD (U/mg prot)	3.1 (\pm 0.26)	3.9 (\pm 0.65)	0.15
GPx (μ moles/min/mg prot)	5.58 (\pm 0.35)	4.92 (\pm 0.34)	0.15
Nitrites (μ M)	0.049 (\pm 0.008)	0.072 (\pm 0.018)	0.07
Nitrates (μ M)	1.745 (\pm 0.26)	1.709 (\pm 0.22)	0.63
PCR (mg/L)	6.0 (\pm 3.77)	6.4 (\pm 5.56)	0.26

* Indicates ANOVA significant difference. ¹Means followed by the same letter, compared in the lines, do not differ (Duncan Test 5% probability error). Results are expressed as means \pm ESD.

Table 4: Evaluation 3 - Effect of different dosis of vitamin E on peripheral markers of oxidative stress in renal disease patients in HD.

	Pre HD Control	Pre HD 800mg Single	Pré HD 400mg day/30days	Pre HD 800mg day/30days	F prob treatment
Chemiluminescence (CL) (cps/mg Hb)	17144 a ¹ ± 772	10997 b ± 679	12936 b ± 1008	8239 c ± 275	<0.0001*
Carbonyls (nmol/mg prot)	11.59 a ±0.66	10.33 b ± 0.68	10.11 b ± 0.50	5.74 c ± 0.41	<0.0001*
CAT (pmoles/mg prot)	7.3 ± 0.77	6.4 ± 0.30	6.7 ± 0.39	8.1 ± 0.74	0.12
SOD (U/mg prot)	3.1 b ± 0.26	3.8 a ± 0.34	4.1 a ±0.21	3.1 b ± 0.22	0.0005*
GPx (µmoles/min/mg prot)	5.58 ab ± 0.35	5.83 ab ±0.40	6.38 a ± 0.39	5.01 c ± 0.29	0.014*
Nitrites (µM)	0.049 ±0.008	0.054 ±0.019	0.068 ± 0.008	0.052 ± 0.010	0.19
Nitrates (µM)	1.74 c ± 0.21	2.04 bc ± 0.18	2.64 a ±0.27	2.25 b ±0.30	0.0003*

* Indicates ANOVA significant difference. ¹Means followed by the same letter, compared in the lines, do not differ (Duncan Test 5% probability error). Results are expressed as means ± ESD.

Captions to figures:

Figure 1: Repercussion of a single hemodialysis session (HD) on the activity of the antioxidant enzyme SOD, and on nitrite levels. $P < 0,01$, repeated-measures ANOVA with Duncan multiple comparisons test. Means followed by the same letter are not different.

Figure 2- Effect of different dosis of vitamin E on peripheral markers of oxidative stress in renal disease patients in HD. Lipidperoxidation (CL) (I) and protein oxidation in carbonyls (II), before an HD session without Vitamin E (Pre HD Control); before an HD session with previous administration of 800mg single dosis (Pre HD 800mg Single); before an HD with previous administration of 400mg/day/30days (Pré HD 400mg Chronic); and before an HD session with previous administration of 800mg/day/30days (Pré HD 800mg Chronic). In (I) and 2 (II), columns represented with the same letter do not differ (Duncan Test 5% probability error). Results are expressed as means \pm ESD.

Figure 1

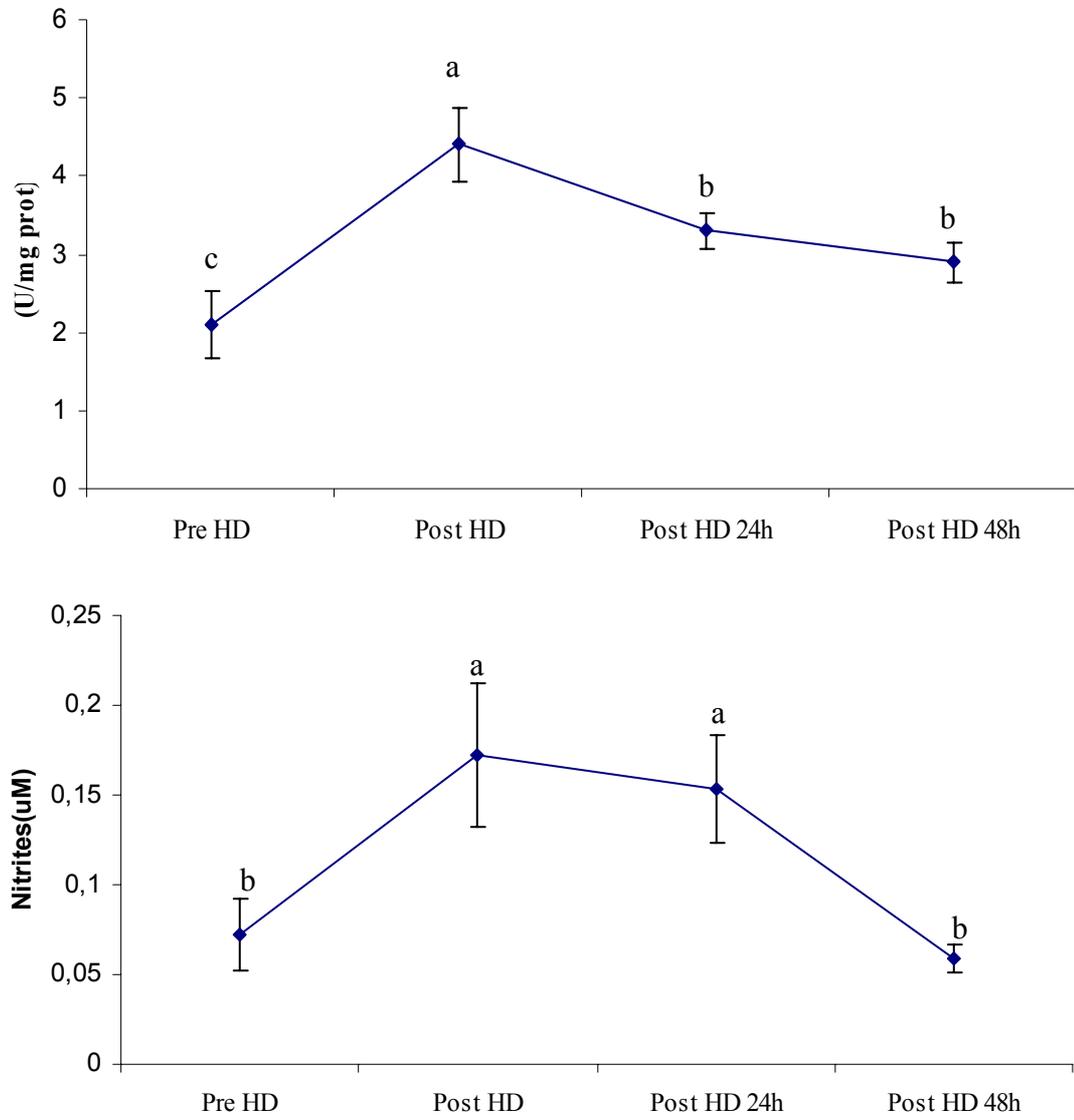


Figure 2

